

ZUR KENNTNISS
DES CASEÏNS
UND
DER WIRKUNG DES LABFERMENTES

VON

OLOF HAMMARSTEN.

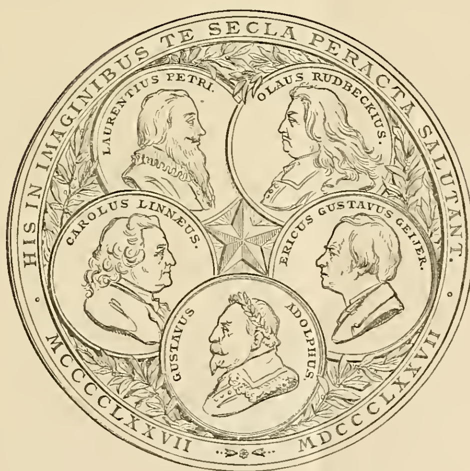
(Mitgetheilt der Königl. Gesellschaft der Wissenschaften zu Upsala am 19 Juli 1877).



ZUM ANDENKEN

DER VIERHUNDERTJÄHRIGEN STIFTUNGSFEIER

DER KÖNIGLICHEN UNIVERSITÄT UPSALA



EHRFURCHTSVOLL VOM VERFASSER.

ZUR KENNTNISS

DES CASEÏNS

UND

DER WIRKUNG DES LABFERMENTES

VON

OLOF HAMMARSTEN.

(Mitgetheilt der Königl. Gesellschaft der Wissenschaften zu Upsala am 19 Juli 1877).

UPSALA 1877,
DRUCK DER AKADEMISCHEN BUCHDRUCKEREI,
ED. BERLING.

Während man, seit den Arbeiten von PELOUZE und F. SIMON [1]), die Milchgerinnung mit Lab fast allgemein als eine secundäre, durch die bei der Gährung des Milchzuckers entstandene Milchsäure vermittelte, Ausscheidung des Caseïns betrachtete, wies ich in meiner ersten, im Jahre 1872 erschienenen Abhandlung über die Milchgerinnung [2]) diese Ansicht als eine durchaus unbegründete und unrichtige zurück. In dieser Abhandlung hob ich nämlich nicht nur die Fähigkeit des Labfermentes die Milch bei amphoterer oder schwach alkalischer Reaction zu coaguliren stark hervor, sondern ich lieferte darin auch den Beweis, erstens, dass auch die absolut milchzuckerfreien Caseïnlösungen mindestens eben so gut wie die Milch selbst mit Lab gerinnen können, und, zweitens, dass das von mir zuerst isolirte, gereinigte Labferment auf den Milchzucker keine umsetzende Wirkung auszuüben im Stande ist. Unabhängig von mir und auf anderen Wegen sind 2 Jahre später KAPPELLER und ALEX. SCHMIDT [3]) zu Resultaten gelangt, welche mit den meinigen vollkommen übereinstimmen, und seitdem nunmehr sämmtliche meine Beobachtungen auch in KÜHNES Laboratorium von KIRCHNER [4]) bestätigt worden sind, muss wohl die Fähigkeit des Labfermentes, das Caseïn auch bei Abwesenheit von Milchzucker zu coaguliren, als eine feststehende Thatsache betrachtet werden.

---

[1]) J. FRANZ SIMON: Handbuch der angewandten medicinischen Chemie. Berlin 1840. Bd. I.

[2]) OLOF HAMMARSTEN: Om mjölk-ystningen och de dervid verksamma fermenterna i magslemhinnan. Upsala läkareförenings förhandlingar. Bd. 8. 1872—1873.

[3]) ALEXANDER SCHMIDT: Ein Beitrag zur Kenntniss der Milch. Dorpat 1874.

[4]) W. KIRCHNER: Beiträge zur Kenntniss der Kuhmilch und ihrer Bestandtheile nach dem gegenwärtigen Standpunkte wissenschaftlicher Forschung. Dresden 1877.

In derselben Abhandlung führte ich auch den Beweis, dass das Alkalialbuminat, selbst wenn es in der Milch aufgelöst wird, bei amphoterer oder schwach alkalischer Reaction gar nicht mit Lab zu coaguliren ist; aber nachdem ich später[1]) die Anwesenheit eines Kalksalzes als ein sehr wichtiges Gerinnungsbedingniss erkannt hatte, blieb es nöthig, mit milchzuckerfreien Lösungen nicht nur von Alkali- sondern auch von Calcium- resp. Calciumphosphatalbuminat Gerinnungsversuche anzustellen. Solche Versuche sind theils von mir, theils unter meiner Leitung von Lundberg[2]) und Mörner angestellt worden, aber stets war der Erfolg ein negativer. Das Verhalten zu Lab ist also etwas für das Caseïn Specifisches und durch diese fundamentale Eigenschaft unterscheidet sich dieser Stoff nicht nur von dem Alkali- resp. Kalkalbuminate sondern auch von jedem anderen, bisher bekannten Eiweisskörper.

Wenn es sich nur darum handelt, diese fundamentale Eigenschaft des Caseïns zu constatiren, kann man allerdings mit der Darstellung einer möglichst reinen Caseïnlösung sich begnügen. Wenn es dagegen darauf ankommt, die näheren Gerinnungsbedingungen zu ermitteln, ist es oft nöthig, mit einem und demselben Caseïn mehrere Versuchsreihen anzustellen, und für diese Fälle ist es nicht nur — wegen der allmählich eintretenden Zersetzung der Caseïnlösungen — bequemer sondern auch im Interesse eines exacten Experimentirens besser, mit einem getrockneten, auf einen Gehalt von Verunreinigungen genauer zu prüfenden Caseïnpräparate zu arbeiten. Es ist nun allerdings nicht schwer, ein reines, trockenes Caseïn darzustellen, aber das in üblicher Weise mit Alkohol und Aether entfettete Caseïn wird durch die Darstellungsmethode leicht derart verändert, dass es schwerlöslicher wird und dem entsprechend auch für Gerinnungsversuche weniger brauchbar ist. Ich habe desshalb auch mein Augenmerk vor Allem auf die Reindarstellung eines getrockneten, durch die chemischen Manipulationen nicht merkbar veränderten Caseïns gerichtet.

Von den Methoden, welche zu dem Zwecke versucht werden könnten, sind nicht alle gleich brauchbar. Die Eigenschaft des Caseïns, durch überschüssiges Kochsalz ausgeschieden zu werden, ist, wie ich in meiner ersten Abhandlung gezeigt habe, für die Darstellung von einem unveränderten, milchzuckerfreien Caseïn von grossem Werthe, und die

[1]) Olof Hammarsten: Om det kemiska förloppet vid Caseïnets coagulation med löpe. Upsala läkareförenings förhandlingar. Bd. 9. 1873—1874.

[2]) L. V. Lundberg: Smärre Bidrag till kännedomen om Caseïnet. Upsala läkaref. förh. Bd. 9.

auf diese Eigenschaft basirte Methode dürfte auch — wegen des im Allgemeinen indifferenten Verhaltens der Neutralsalze zu Eiweisskörpern — vielleicht von allen die grösste Garantie für die Reingewinnung eines unveränderten Caseïns darbieten. Diese meine Methode wird auch von Kirchner[1]) der üblichen Darstellung des Caseïns durch Fällen mit einer Säure vorgezogen. Wenn es sich um die Darstellung eines ganz reinen Caseïnpräparates handelt, ist indessen die sonst gute Kochsalzmethode nicht recht brauchbar, denn wenn sie auch die Entfernung des Fettes und des Milchzuckers gestattet, ist doch die Entfernung sämmtlicher Mineralbestandtheile durch sie nicht möglich. Es kann zwar die Hauptmasse der Mineralbestandtheile mit dem rückständigen Kochsalze durch Dialyse entfernt werden, aber ein vollständiges Entfernen sämmtlicher Mineralbestandtheile gelingt nicht einmal durch sehr anhaltende Dialyse. In den Versuchen von Kappeller schied sich nämlich das Caseïn nach lange fortgesetzter Dialyse allmählich vollkommen aus, aber dieses Caseïn, welches noch Spuren von Calciumphosphat enthielt, war in Folge der Dialyse so unlöslich geworden, dass es weder in dem Milchdiffusate noch in Essigsäure oder Natronlauge sich auflöste.

Nach dem eben Gesagten ist es leicht begreiflich, dass ich die Dialyse nicht als eine Methode zur Reingewinnung des Caseïns brauchen konnte. Es war übrigens diese Methode auch schon desshalb nicht zu brauchen, weil sie nur für die Darstellung von kleineren Caseïnmengen geeignet ist.

Es kann also ein ganz reines, d. h. ein auch von Mineralbestandtheilen ganz freies Caseïn weder durch die Kochsalzmethode noch durch Dialyse gewonnen werden, und da nun, wie ich in meiner zweiten Abhandlung gezeigt habe, die Mineralbestandtheile einen ausserordentlich grossen Einfluss auf die Caseïngerinnung ausüben, musste ich mich also nach einer anderen Methode umsehen. Es blieb mir dabei nur übrig, die Fällung des Caseïns mit einer Säure zu versuchen.

Gegen die Methode, das Caseïn mit einer Säure zu fällen, welche Methode ich der Kürze halber hier die Säuremethode nennen will, kann man einwenden, dass die Eiweisskörper im Allgemeinen, und demnach wahrscheinlich auch das Caseïn, durch Säuren leicht verändert werden. Diese Einwendung, welche in der That von Kirchner erhoben worden ist, scheint mir doch von nur untergeordneter Bedeutung zu sein. Es ist nämlich allerdings wahr, dass sämmtliche Eiweissstoffe durch Säuren

---

[1]) A. a. O. p. 40.

in Acidalbumine übergeführt werden können, aber es ist dazu oft eine anhaltende Einwirkung der Säure nöthig, und stets muss dabei die Säure im Ueberschuss vorhanden sein. Es werden also, um nur ein Beispiel anzuführen, sogar Globuline, die doch leichter als andere Eiweissstoffe in Acidalbumine umgewandelt werden, nur in saurer Lösung, also nur bei Ueberschuss von Säure, in Syntonine übergeführt, während sie, wie dies z. B. mit dem Paraglobulin der Fall ist, ohne eine nachweisbare Veränderung zu erleiden, durch Säurezusatz gefällt werden können. Nun vermeidet man bekanntlich bei der Ausfüllung des Caseïns — gerade wegen der Leichtlöslichkeit dieses Eiweissstoffes in überschüssiger Säure — jeden Säureüberschuss, und mit dem Säurezusatze beabsichtigt man nur, das Caseïn aus seiner Verbindung mit Alkalien oder alkalischen Erden frei zu machen. Lege ich noch hierzu, dass das Caseïn eine ungemein weniger veränderliche Substanz als die Globuline ist, so kann ich den von Kirchner gegen die Säuremethode ausgesprochenen theoretischen Bedenken keine grössere Bedeutung beilegen.

Sieht man von den theoretischen Bedenken ab und fragt man, wie es thatsächlich mit der Resistenz des Caseïns gegen Säuren sich verhält, so muss, wie ich glaube, die Säuremethode unzweifelhaft als eine berechtigte angesehen werden. Meine Versuche haben nämlich gelehrt, dass es kaum irgend ein bisher bekannter Eiweissstoff giebt, welcher gegen Säuren eine grössere Resistenz besitzt als das Caseïn, und belehrend sind in dieser Beziehung vor Allem die von Lundberg [1]) unter meiner Leitung ausgeführten Versuche.

Als Unterscheidungsmerkmal zwischen dem Caseïn einerseits und dem Syntonin oder Alkalialbuminate andererseits benutzte Lundberg das ungleiche Verhalten der genannten Eiweissstoffe zu Lab, und von diesem Verhalten ausgehend bestimmte er die Geschwindigkeit, mit welcher das Caseïn durch Säuren oder Alkalien in Acid- resp. Alkalialbuminat übergeführt wird. Es stellte sich dabei heraus, dass das Caseïn nicht nur im Allgemeinen eine grosse Resistenz gegen Säuren besitzt, sondern speciell der Einwirkung von Säuren einen grösseren Widerstand als der Einwirkung von Alkalien leistet. Als Belege für die Widerstandsfähigkeit des Caseïns gegen Säuren erlaube ich mir aus Lundbergs Abhandlung hier folgende Daten anzuführen. Eine Lösung, welche bei einem Säuregehalte von 0,25 % HCl 1,8 % Caseïn in Lösung hielt, konnte 8 Stunden bei 45° C. digerirt werden, ohne dabei in Acidalbumin überzu-

[1]) A. a. O.

gehen. Ein anderer Theil derselben Lösung, welcher in einem kühlen Zimmer bei 0^0 C. bis $+5^0$ C. aufbewahrt wurde, war nach Verlauf von 14 Tagen noch nicht merkbar verändert worden. Ein dritter Theil derselben sauren Lösung konnte endlich 40 Minuten lang gekocht werden, ohne nachweisbar in Syntonin überzugehen, während nach 2-stündigem Kochen sämmtliches Caseïn in Acidalbuminat übergeführt worden war.

Es ist nun freilich nicht unmöglich sondern im Gegentheil sogar wahrscheinlich, dass eine geringfügige, theilweise Umwandlung des Caseïns übersehen werden könne, so lange noch die Hauptmasse dieses Stoffes ihre Gerinnungsfähigkeit mit Lab nicht eingebüsst hat. Die eben angeführten Versuche beweisen also vielleicht nicht, dass das Caseïn innerhalb der genannten Zeiträume absolut keine Veränderung erlitten hatte; aber immerhin möchten sie doch beweisen, dass wenigstens der unverhältnissmässig grösste Theil des Caseïns bezüglich des Verhaltens zu Lab ganz unverändert geblieben war, und hierin sehe ich einen Beweis für die unerwartet grosse Widerstandsfähigheit des Caseïns gegen Säuren. Die Fähigkeit mit Lab zu gerinnen ist nämlich etwas für das Caseïn Specifisches, und so lange diese Eigenschaft noch erhalten ist, kann ich unmöglich an eine durchgreifende Veränderung des Caseïns durch die Säurewirkung glauben.

Es könnte also das Caseïn durch die Säuremethode höchstens eine nur geringfügige, auf das Verhalten zu Lab nicht einwirkende Veränderung erleiden; aber eine solche Veränderung müsste doch jedenfalls auch durch irgend eine neue Eigenschaft des Caseïns sich kund geben. Nun habe ich indessen bei mehreren Gelegenheiten das zu wiederholten Malen mit Essigsäure ausgefällte Caseïn mit dem typischen Caseïn der Kuhmilch verglichen, ohne dabei in irgend einer Hinsicht, sei es in Bezug auf Löslichkeit oder Fällbarkeit, einen Unterschied zwischen beiden zu bemerken; und da, nach meiner Ansicht, erst dann von einer Veränderung die Rede sein kann, wenn diese Veränderung durch irgend eine veränderte Eigenschaft des fraglichen Stoffes sich kund giebt, kann ich auch gegenwärtig nicht an eine Veränderung des Caseïns durch die Säuremethode — eine sorgfältige und vorsichtige Arbeit vorausgesetzt — glauben. Ich betrachte also diese Methode nicht nur als eine berechtigte sondern auch als die beste, wenn es sich um die Darstellung eines möglichst reinen Caseïns handelt.

Bei der Darstellung des Caseïns nach dieser Methode verfahre ich in folgender Weise.

Die frische Kuhmilch — das von mir ausschliesslich benutzte Material — wird mit 4 Vol. Wasser verdünnt und darauf mit so viel Essigsäure versetzt, dass die zugesetzte Säuremenge, auf die verdünnte Milch bezogen, etwa 0,075—0,1 % beträgt. Wenn man bei dem angegebenen Verdünnungsgrade diese Säuremenge wählt, wird nicht nur das Caseïn ohne nennenswerthe Verluste ziemlich vollständig ausgeschieden, sondern es setzt sich dabei auch ungemein rasch zum Boden und bildet binnen Kurzem einen compacten Bodensatz, von dem die obenstehende Flüssigkeit leicht mit einem Heber abgehoben werden kann. Eine Säuremenge von etwa 0,05 % Ä kann nicht mit Vortheil zum Fällen der frischen Milch benutzt werden, denn durch sie wird das Caseïn, wenn überhaupt ein Niederschlag entsteht, nur höchst unvollkommen gefällt und man erleidet also höchst bedeutende Verluste an Caseïn. Grössere Säuremengen können zwar benutzt werden, aber da man mit ihnen — wenn sie auch vielleicht nicht schädlich wirken — nicht besser zum Ziele gelangt, und übrigens leicht durch Wiederauflösen von einem Theile des Caseïns Verluste erleiden kann, verfahre ich stets so, dass ich dem Gemische von Wasser und Milch etwa 0,075—0,1 % Essigsäure zusetze.

Es ist klar, dass diese Zahlen mit einer wechselnden Beschaffenheit der Milch auch wechseln können; da indessen der Alkaligehalt der frischen Milch keinen grossen Schwankungen unterliegt, dürften sie doch vielleicht für die meisten Fälle brauchbar sein. Uebrigens muss ich hier bemerken, dass die angeführten Zahlen nur auf die mit destillirtem Wasser verdünnte Milch sich beziehen, während sie für eine mit Brunnen- oder Wasserleitungswasser verdünnte Milch nicht gelten können.

Verdünnt man die Milch mit Brunnen- oder Wasserleitungswasser, so muss nach meiner Erfahrung auch die Säuremenge stets etwas grösser genommen werden. Dies gilt wenigstens, wie ich durch ein paar Versuche zeigen werde, bei Verdünnung mit Wasser aus der hiesigen Wasserleitung. [1])

[1]) Das hiesige Wasserleitungswasser hat nach einer Zusammenstellung, die ich Almèns Abhandlung »Huru bör ett dricksvattens godhet bedömmas från sanitär synpunkt?» Svenska läkaresällskapets nya handlingar Ser. II. Del III. Stockholm 1871. entnommen habe, folgende Zusammensetzung. 100000 Th. Wasser enthalten:

Calciumsulfat	3,415
Calciumcarbonat	14,602
Magnesiumcarbonat	3,856
Kaliumcarbonat	1,217
Natriumcarbonat	1,234
Chlornatrium	3,020
Kieselsäure	0,800

Von einer ganz frischen Kuhmilch wurden 2 Portionen auf je 20 Cc. abgemessen und die eine mit 80 Cc. destillirtem Wasser, die andere mit 80 Cc. Wasserleitungswasser verdünnt. Darauf wurden beide mit einer Zehntelnormalessigsäure versetzt, bis der erste bleibende Niederschlag sichtbar wurde. Es waren dazu erforderlich bei Anwendung von destillirtem Wasser 12 Cc. und bei Anwendung von Wasserleitungswasser 16,6 Cc. Im ersten Falle entstand also ein bleibender Niederschlag bei einem Gehalte von 0,072 und in dem letzteren bei einem Gehalte von 0,0996 % Essigsäure. In einem anderen Versuche mit Milch, 8 Tage später von derselben Kuh genommen, waren auf 100 Cc. des Gemisches von Milch und Wasser erforderlich: bei Anwendung von destillirtem Wasser 12,1 Cc. und bei Anwendung von Wasserleitungswasser 16,7 Cc, also fast absolut dieselbe Menge wie 8 Tage früher. In diesem Falle entstand also der erste bleibende Niederschlag bei Verdünnung mit destillirtem Wasser bei einem Gehalte von 0,0726 und bei Verdünnung mit Wasserleitungswasser bei einem Gehalte von 0,1002 % Essigsäure. Um eine möglichst vollständige Ausfällung des Caseïns zu erzielen, waren in beiden Fällen noch grössere Essigsäuremengen nöthig. Diese ungleiche Wirkung von destillirtem Wasser und Wasserleitungswasser hängt anscheinend von dem Gehalte des letzteren an Calcium- und Magnesiumcarbonat ab. Diese Salze sind nämlich sehr vorzügliche Lösungsmittel für das Caseïn.

Das ausgefällte Caseïn kann zuerst durch Decantation mit Wasser gewaschen werden, und es ist dabei unerlässlich, die Decantation nur mit destillirtem Wasser auszuführen. Dies ist selbst dann unerlässlich, wenn man auf die Darstellung eines möglichst reinen, namentlich von Mineralbestandtheilen freien Caseïns verzichtet, denn das Caseïn ist so ungemein leicht löslich nicht nur in Alkalien, sondern auch in alkalischen Erden und deren Carbonaten, dass es, wenigstens wenn es nicht mit überschüssiger Säure gefällt wurde, sich allmählich in Wasserleitungswasser, wenn auch langsam, wieder auflösen kann. Bei Decantation mit Wasserleitungswasser setzt sich desshalb auch das Caseïn nicht nur langsam und schwierig zum Boden, sondern es gehen auch sehr bedeutende Mengen davon durch Wiederauflösung verloren.

Uebrigens ist es wichtig, dass man beim Auswaschen mit Decantation rasch arbeitet und nicht das ausgefällte Caseïn lange unter Wasser stehen lässt. Es wird nämlich das Caseïn dadurch etwas schwerlöslicher und es büsst gleichzeitig theilweise die Fähigkeit, das Calciumphosphat zu lösen, ein. Schon das Stehen unter viel Wasser über eine

Nacht kann nachtheilig wirken, während das Aufbewahren des feuchten, von dem überschüssigen Wasser befreiten Caseïns auf einem Filtrum als viel weniger schädlich sich erwiesen hat.

Das durch Decantation rasch gewaschene Caseïn wird auf Leinwand gesammelt, ausgepresst und endlich portionenweise mit Wasser in einer Reibschale fein zerrieben. Das fein zerriebene, in Wasser vertheilte Caseïn wird durch vorsichtigen Zusatz von einer verdünnten Natronlauge gelöst, wobei man darauf achten muss, dass der Flüssigkeit keine entschieden alkalische Reaction ertheilt werde. Das Caseïn ist nämlich sehr empfindlich gegen die Einwirkung von Alkalien, und es muss desshalb jeder Ueberschuss davon strenge vermieden werden, um so mehr, als er auch in anderer Weise schädlich wirkt und übrigens gar nicht nöthig ist. Das ungemein leichtlösliche Caseïn löst sich nämlich bei dieser Behandlungsweise nicht nur bei neutraler, sondern sogar bei deutlich saurer Reaction auf, und wenn man das Alkali allmählich zusetzt, bis eine bleibende, schwach saure oder kaum neutrale Reaction erhalten wird, löst sich das Caseïn binnen Kurzem vollständig auf, wenn auch wegen der grossen Fettmenge es dem Ungeübten nicht immer leicht ist zu sehen, wann eine vollständige Lösung eingetreten ist.

Es ist noch ein zweiter Grund vorhanden, warum man das Caseïn in möglichst wenig Alkali lösen soll. Dieser zweite Grund ist der, dass wegen der später zu zeigenden Löslichkeit des Caseïns in Natriumacetat die Menge der zu der folgenden Ausfällung nöthigen Säure mit der Menge des anwesenden Alkalis, resp. des gebildeten Natriumacetates, wachsen muss. Um bei der folgenden Ausfällung des Caseïns mit Säure einen vielleicht schädlich wirkenden Säureüberschuss vermeiden zu können, ist es also nöthig, bei der Auflösung des Caseïns in Alkali die Menge des Alkalis möglichst klein zu nehmen.

Die nach stattgehabter Lösung milchähnliche Flüssigkeit filtrirt man durch mehrfache Filtren und erhält dabei, wenn die Filtren fehlerfrei sind, ein nur schwach bläulichweiss opalisirendes Filtrat, in dem gar keine Milchkügelchen mit dem Mikroskope zu sehen sind. Sämmtliche Fettkügelchen werden von den Filtren zurückgehalten.

Das so gewonnene, erste Filtrat wird mit Wasser verdünnt und mit Essigsäure gefällt. Das Caseïn scheidet sich dabei grobflockig aus und setzt sich leicht zum Boden, aber es bildet auch sehr harte Körnchen oder Klümpchen, die durch Schütteln zwar feiner aber doch nie so fein werden, dass sie mit Wasser vollständig ausgewaschen werden könnten. Ich sammle desshalb das zum zweiten Male gefällte Ca-

seïn auf Filtren, lasse die Flüssigkeit abtropfen, nehme dann das Caseïn portionenweise von den Filtren und zerreibe es unter Wasser so fein wie möglich, bis keine grösseren Körnchen mehr sichtbar sind und das Ganze das Aussehen einer feinen Emulsion angenommen hat. Nachdem sämmtliches mit Wasser fein zerriebene Caseïn in ein Becherglas aufgesammelt worden ist, bringe ich es auf Filtren, wobei diejenigen Caseïnkörnchen, welche vielleicht der Zerreibung entgangen sind und zum Boden des Gefässes sich gesetzt haben, separat aufgesammelt und noch ein Mal zerrieben werden. Das fein zerriebene Caseïn wird auf Filtren mit Wasser ausgewaschen.

Es ist dieses Zerreiben unzweifelhaft eine sehr zeitraubende und mühsame Operation, besonders wenn man grössere Mengen Milch in Arbeit nimmt; aber wer die harten Körnchen oder Flöckchen gesehen hat, die das gefällte, entfettete Caseïn oft darstellt, dem wird es auch gewiss nicht entgehen können, dass ein vollständiges Auswaschen von diesem Caseïn — sei es durch Decantation oder auf dem Filtrum — ein mehr weniger illusorisches Unternehmen sein muss. Für die unerwartet grossen Schwierigkeiten, mit welchen ein vollständiges Auswaschen des Caseïns selbst nach einem solchen Zerreiben verbunden ist, werde ich in dieser Abhandlung besondere Beweise bringen.

Das zum zweiten Male gefällte, gewaschene Caseïn wird, nachdem es vom Filtrum genommen und wieder zerrieben worden ist, wieder in Wasser durch Zusatz von möglichst wenig Natronlauge gelöst. Die filtrirte Lösung wird wieder mit Essigsäure gefällt, der Niederschlag fein zerrieben und mit Wasser ausgewaschen. Zuletzt wird das zum dritten Male mit Essigsäure gefällte Caseïn mit dem Filtrum zwischen Papier ausgepresst, aber nicht stärker, als dass es leicht von dem Filtrum als eine feste, von anhaftenden Theilen des letzteren nicht verunreinigte Masse weggenommen werden kann.

Dieses Caseïn wird nun rasch mit Alkohol von 97% portionenweise zu einer feinen Emulsion zerrieben und unmittelbar darnach auf Filtren gebracht, damit der Alkohol nur möglichst kurze Zeit mit dem Caseïn in Berührung bleibe. Nachdem sämmtliches Caseïn unter Alkohol zerrieben und durch Filtration grösstentheils von dem, durch das von dem Caseïn zurückgehaltene Wasser etwas verdünnten, Alkohol befreit worden ist, wäscht man es rasch auf dem Filtrum erst mit starkem Alkohol und dann mit Aether, um den Alkohol zu verdrängen. Wenn dies geschehen ist, presst man zwischen Papier aus, bringt das von dem Filtrum leicht sich ablösende Caseïn in eine grosse Reibschale und lässt

der rückständige Aether unter stetigem Zerreiben verdunsten. Man erhält auf diese Weise zuletzt ein staubfeines, schneeweisses Caseïn, welches, nachdem es auf die oben angeführte Weise von dem Aether möglichst befreit worden ist, zuletzt mit der Luftpumpe vollständig über Schwefelsäure getrocknet wird. Nach dem vollständigen Trocknen kann dieses Caseïn ohne Schaden im Luftbade auf 100⁰ C. erhitzt werden.

Wie man aus dem Obigen ersieht ist die angegebene Darstellungsmethode eine ziemlich umständliche; aber wenn man nicht auf ein ganz reines Präparat verzichten will kann sie kaum weniger umständlich werden. Die mühsamste Operation ist unzweifelhaft das feine Zerreiben, aber gerade auf dieses muss ich sehr grosses Gewicht legen, weil das Auswaschen sonst kaum möglich wird. Es könnte vielleicht genügend erscheinen, das Caseïn nur 2 Mal mit Essigsäure zu fällen, und ich habe in der That auch in mehreren Fällen nach 2-maligem Ausfällen ein ganz reines Caseïn erhalten. Es gelingt dies doch nicht immer, und desshalb muss ich auch, wenn man ein möglichst reines Caseïn erhalten will, ein 3-maliges Ausfällen empfehlen.

Das auf die eben angeführte Weise gewonnene Caseïn ist fast absolut frei von Mineralbestandtheilen. Es ist freilich nicht unmöglich, dass bei Einäscherung von sehr grossen Caseïnmengen bestimmbare Mengen von Mineralbestandtheilen nachgewiesen werden können, aber selbst bei Verbrennung von 4—6 Gm. bei 110⁰ C. getrockneten Caseïns habe ich höchstens kaum sicher nachweisbare Spuren von Aschenbestandtheilen entdecken können. Dieses Caseïn ist also besonders für solche Versuche zu empfehlen, in welchen es sich gerade darum handelt, die Wirkung verschiedener Mineralbestandtheile festzustellen.

Es ist bekanntlich sehr schwer, das Caseïn durch Extraction mit Aether gänzlich zu entfetten, aber nach dem von mir geübten Verfahren erhält man leicht ein fettfreies Caseïn. Bei Verwendung von doppelten Filtren können nämlich die Milchkügelchen so vollständig zurückgehalten werden, dass, wie oben gesagt, in dem nur schwach opalisirenden Filtrate gar keine Fettkügelchen mit dem Mikroskope zu sehen sind. Es ist dies zwar an sich keine genügende Bürgschaft für die Abwesenheit von Fett in dem Präparate; aber das nach meinem Verfahren dargestellte Caseïnpräparat enthält meistens, selbst wenn es nicht weiter mit Aether gereinigt worden ist, nur Spuren von Fett.

Wegen der staubichten Feinheit des Caseïnmehles kann das Präparat übrigens leicht mit warmem Aether ganz vollständig entfettet werden, was unbeschadet der Löslichkeit und der übrigen Eigenschaften

des Caseïns versucht werden kann. Das mit Alkohol entwässerte, in Vacuo vollständig getrocknete Caseïn kann nämlich ohne Schaden wiederholt mit Aether ausgekocht werden.[1])

Selbst wenn ich mit der grössten Sorgfalt arbeitete, konnte ich doch nicht verhindern, dess einzelne, von den Filtren herrührende Fäserchen oder andere Staubpartikelchen das Präparat verunreinigten. Diese Fäserchen oder Staubpartikelchen werden erst sichtbar, wenn das Caseïn gelöst wird, und sie dürften wohl kaum von Bedeutung sein. Jedenfalls bilden sie die einzige nachweisbare Verunreinigung bei sonst gelungener Darstellung des Präparates.

Das nach der geschilderten Methode dargestellte Caseïn verhält sich in allen Beziehungen ganz wie das typische Caseïn der Kuhmilch. Wie dieses löst es sich sehr leicht nicht nur in Alkalien, deren Carbonaten und Phosphaten, sondern es löst sich auch in Kalk- oder Barytwasser, sowie in Wasser, welches fein vertheiltes Calcium-, Baryum- oder Magnesiumcarbonat enthält. Die Lösungen gerinnen nicht beim Sieden, aber sie überziehen sich dabei mit der bekannten Haut. Von Säuren sowie von Neutralsalzen werden sie unter denselben Verhältnissen wie die Milch selbst gefällt. Von überschüssiger Säure, insbesondere von Salzsäure, wird dieses Caseïn leicht gelöst.

Die Fähigkeit, reichliche Mengen von Calciumphosphat in Lösung zu halten, kommt diesem Caseïn in gleich hohem Grade wie dem typischen der Kuhmilch zu. Die Lösungen von Caseïncalciumphosphat[2]) gerinnen nicht beim Sieden sondern überziehen sich dabei nur mit einer Haut; mit Lab gerinnen sie noch rascher als die Milch. Nur bei etwas unvorsichtiger Arbeit, wenn man z. B. etwas zu viel Alkali verwendet, das ausgefällte Caseïn längere Zeit unter Wasser stehen lässt, das Präparat zu lange mit Alkohol behandelt oder das nicht ganz vollständig in Vacuo ausgetrocknete Caseïn im Luftbade erhitzt, wird die Fähigkeit das Calciumphosphat zu lösen etwas herabgesetzt.

---

[1]) Das wiederholte Auskochen mit Alkohol scheint mir dagegen nicht gleich unschädlich zu sein. Ich habe nämlich in einigen Fällen nach anhaltendem Auskochen des Caseïns mit 97%-tigem Alkohol eine merkbar verminderte Löslichkeit desselben beobachtet, und ich kann also höchstens ein kurzdauerndes Auskochen mit Alkohol empfehlen.

[2]) Dieser Ausdruck wird hier, wie in den früheren Abhandlungen, nur der Kürze halber gebraucht, ohne dass ich damit über die Art, in welcher das Caseïn und das Calciumphosphat einander lösen, etwas ausgesagt haben will.

Es giebt sich diese verminderte Lösungsfähigkeit für phosphorsauren Kalk besonders dadurch kund, dass es schwierig ist, von einem solchen Caseïn eine Lösung herzustellen, welche bei etwa demselben Gehalte an Calciumphosphat wie die Milch nur mit Lab und nicht auch in der Siedehitze allein gerinnt. Von einem Präparate, dessen Darstellung gut gelungen ist, kann man dagegen leicht eine calciumphosphatreiche Lösung bereiten, welche mit Lab rasch und bei niedriger Temperatur gerinnt, während sie nicht beim Sieden sondern — wie die Milch — erst beim Erhitzen im zugeschmolzenen Rohre auf 130—140° C. gerinnt.

Das Caseïn ist nicht absolut unlöslich in Wasser, und wenn man das zu wiederholten Malen zerriebene, noch feuchte Caseïn beliebig lange mit Wasser auswäscht, können stets — wenn auch fast verschwindend kleine — Spuren von Eiweiss in den Filtraten nachgewiesen werden. Selbst das bei 100° C. getrocknete, vorher mit Alkohol entwässerte und mit Aether behandelte Caseïn ist nicht absolut unlöslich in Wasser, wovon man sich leicht überzeugt, wenn dieses Caseïn in Wasser vertheilt und nach einiger Zeit abfiltrirt wird. Die Filtrate enthalten in diesem Falle zwar ausserordentlich kleine, aber doch mit Gerbsäure deutlich nachweisbare Spuren von Eiweis.

Das Caseïn verhält sich wie eine ziemlich starke Säure. Es treibt Kohlensäure aus dem Calciumcarbonate aus und es färbt blaues Lackmuspapier stark roth. Diese Wirkung auf Lackmuspapier bleibt noch bestehen, wenn man das Auswaschen mit Wasser beliebig lange fortsetzt. Wenn man das anhaltend ausgewaschene Caseïn von den Filtren nimmt und zwischen Fliesspapier oder Leinwand stark auspresst, wird das Lackmuspapier zwar von der ausgepressten Flüssigheit gar nicht merkbar verändert, aber wenn man einige Caseïnkörnchen auf das Papier legt entstehen sogleich fast ziegelrothe Pünktchen. Auch das mit Alkohol und Aether wiederholt gewaschene, bei 110° C. getrocknete Caseïn bringt, wenn man es trocken auf ein feuchtes blaues Lackmuspapier legt, dieselbe rothe Färbung hervor. Das mit Säuren niedergeschlagene Caseïn wirkt also auf Lackmuspapier wie eine starke Säure.

Dieses Verhaltens ist, so weit ich gefunden habe, in den neueren Lehrbüchern der physiologischen Chemie keine Erwähnung gethan, während es den älteren Forschern nicht entgangen ist. Bei einem Durchgehen der älteren Literatur habe ich nämlich bei Rochleder eine hierher gehörende Angabe gefunden. In einer Abhandlung »Beiträge zur

Kenntniss des Käsestoffs»[1]) hebt dieser Forscher die saure Reaction des Caseïns ausdrücklich hervor, un er sagt, dass das Caseïn, sowohl das aus saurer Lösung durch kohlensaures Natron niedergeschlagene wie auch das aus alkalischer Lösung durch Säuren gefällte, blaues Lackmuspapier röthet. Diese Eigenschaft soll das Caseïn nach Rochleder auch nach dem Trocknen bei 145⁰ C. beibehalten, ohne dem Wasser, womit man es kocht, diese Eigenschaft mitzutheilen.

Mit diesen Angaben von Rochleder stimmt, wie oben gezeigt wurde, meine eigene Erfahrung vollständig überein, und ich stehe also nicht an zu behaupten, dass das mit Säuren niedergeschlagene, möglichst sorgfältig ausgewaschene Caseïn, wenn man es auf feuchtes Lackmuspapier bringt, ausnahmslos dieses stark röthet ohne dem Wasser selbst eine saure Reaction zu ertheilen.

Dieses Verhalten des Caseïns ist, wie ich glaube, einer weiteren Untersuchung werth und es ist von einem nicht unbedeutenden Interesse der Ursache dieser sauren Reaction nachzugehen. In Bezug auf die Ursache dieser Reaction sind offenbar mehrere Möglichkeiten denkbar. Es könnte vielleicht das Caseïn bei Ausfällung mit einer Säure — wie die älteren Forscher meinten — als eine (sauer reagirende) chemische Verbindung mit der angewendeten Säure sich ausscheiden, es könnte weiter die zur Fällung benutzte Säure vielleicht dem gefällten Caseïn so hartnäckig anhaften, dass sie nicht durch Waschen mit Wasser zu entfernen sei, oder es könnte endlich das Caseïn — wie dies nach den Untersuchungen von Hruschauer[2]) mit dem Hühnereiereiweisse der Fall sein soll — selbst eine Säure sein. Ich habe geglaubt, dass es der Mühe werth sein sollte, diese Möglichkeiten zum Gegenstande einer besonderen Prüfung zu machen, und aus dem Grunde habe ich auch einige Versuche angestellt. Bevor ich zu diesen Versuchen übergehe sei mir doch zuerst ein Rückblick auf die einschlägige Literatur gestattet.

Um das Caseïn aus der Milch darzustellen, soll man nach Berzelius[3]) verdünnte, abgerahmte Milch mit Schwefelsäure fällen, den Niederschlag mit Wasser auswaschen und darauf mit kohlensaurem Kalk oder Baryt digeriren. Dabei löst sich das Caseïn allmählich auf und die

---

[1]) Wöhler & Liebig: Annalen der Chemie und Pharmacie. *Bd. 45.* 1843.

[2]) Franz Hruschauer: Ueber Albumin und dessen Verhalten zu Säuren. Annal. d. Ch. u. Ph. *Bd. 46.* 1843.

[3]) J. Jacob Berzelius: Lehrbuch der Thier-Chemie, übersetzt von F. Wöhler. Dresden 1831.

Lösung kann durch Filtration von dem überschüssigen Erdsalze getrennt werden. Dieses Verfahren gründet sich nach der Ansicht von BERZELIUS darauf, dass der Käsestoff durch das Erdsalz aus seiner Verbindung mit der Schwefelsäure frei gemacht wird; und der beim Fällen der Milch mit einer Säure entstehende Niederschlag ist also nach BERZELIUS eine Verbindung zwischen dem Caseïn und der zur Fällung benutzten Säure.

Diese Ansicht findet man auch bei anderen älteren Forschern, insbesondere bei MULDER und SIMON. MULDER[1]) fand in dem mit Schwefelsäure gefällten, zwanzig Mal ausgepressten und mit Alkohol ausgekochten Caseïn 2,89 % Schwefelsäure neben 0,30 % Schwefel, während das von ihm mit Essigsäure gefällte Caseïn keine Schwefelsäure, sondern nur 0,36 % Schwefel enthielt. Das mit Schwefelsäure gefällte Caseïn enthielt auch 1,83 % Phosphorsäure, die — wenn ich SIMON, aus dessen Lehrbuche diese Angaben entlehnt sind, richtig verstanden habe — auch mit dem Caseïn chemisch verbunden sein sollten.

SIMON[2]) fand in dem mit verdünnter Schwefelsäure aus Kuhmilch gefällten, anhaltend gewaschenen und mit Aether von dem Fette befreiten Caseïn 2,53 % Schwefelsäure. Er betrachtet auch den bei Zusatz von Säuren zu Milch entstehenden Niederschlag als eine chemische Verbindung zwischen Caseïn und Säure, und er spricht wiederholt von der Existenz solcher Verbindungen, wie von einer ganz sichergestellten Thatsache.

Von ganz derselben Ansicht sind auch BOUTRON & FREMY.[3]) Sie bemühen sich nämlich, die beim Sauerwerden der Milch stattfindende Caseïnausscheidung durch die Annahme von einer Verbindung zwischen Caseïn und Milchsäure zu erklären, und sie sagen darüber, pag. 194, Folgendes: »*Da man weiss, dass alle Säuren mit dem Caseïn unlösliche Verbindungen bilden*[4]), so erklärt sich hieraus leicht das Coaguliren der Milch, wenn man annimmt, dass sich eine gewisse Menge Milchsäure gebildet hat, die sich, mit dem Caseïn verbindend, die Entstehung des weissen unlöslichen Körpers veranlasst, welcher auch sogleich erhalten wird,

---

[1]) F. SIMON: Handbuch der angewandten medicinischen Chemie. 1. Theil. Berlin 1840. P. 92.

[2]) F. SIMON: Handbuch der angewandten medicinischen Chemie. 1. Theil. Berlin 1840.

[3]) F. BOUTRON & E. FREMY: Untersuchungen über die Milchgährung. Annal. d. Ch. u, Ph. Bd. 39. 1841.

[4]) Die Auszeichnung dieser Worte ist in dem Originaltexte nicht vonhanden, sondern sie rührt von mir her.

wenn man etwas Milchsäure in frische Milch giesst.» Auf der folgenden Seite sagen sie: »Bei der genauen Beobachtung des freiwillig in der sauer werdenden Milch gebildeten unlöslichen Körpers fanden wir, dass dieser eine eigentliche Verbindung von Caseïn mit Säure sei — — —;» *wie* sie aber zu diesem Schlusse gelangt sind, darüber finde ich in ihrer Abhandlung keine weitere Angaben.

Ganz anders lauten die Angaben von Scherer und Rochleder. Scherer[1]) analysirte einerseits das mit Alkohol aus der Milch gefällte und andererseits das durch spontane Säuerung oder durch Essigsäurezusatz ausgeschiedene Caseïn, aber er konnte keinen Unterschied in dem Kohlenstoff-, Wasserstoff- oder Stickstoffgehalte der verschiedenen Präparate auffinden.

Rochleder[2]) schlug das Caseïn aus der Milch mit Schwefelsäure nieder, löste den Niederschlag in kohlensaurem Natron und fällte wiederum mit Schwefelsäure. Diese Manipulation (das Fällen mit Schwefelsäure) wurde im Ganzen 3 Mal wiederholt, worauf das zum dritten Male ausgefällte Caseïn 15—20 Mal mit der 60—70-fachen Menge destillirten Wassers zum Kochen erhitzt wurde. Das auf diese Weise gereinigte Caseïn erwies sich bei einer besonders darauf gerichteten Untersuchung als ganz schwefelsäurefrei. In einem anderen, durch Fällen mit Essigsäure dargestellten und in der eben angeführten Weise mit Wasser gewaschenen Caseïn liess sich keine Essigsäure nachweisen, und Rochleder zog desshalb aus seinen Versuchen den Schluss, dass das Caseïn durch Säuren aus seinen Verbindungen mit Alkalien nicht in Verbindung mit den zur Fällung angewandten Säuren sondern als reines säurefreies Caseïn gefällt werde. Das reine Caseïn ist nach Rochleder eine in Wasser beinahe ganz unlösliche Substanz; das sogenannte lösliche Caseïn ist eine Verbindung von Caseïn mit Kali, Natron oder Kalk, und das Coaguliren des löslichen Caseïns durch Säuren besteht nach ihm in nichts Anderem als in der Verbindung der Säure mit dem Kali, Natron oder Kalk der Caseïnverbindung, wobei selbstverständlich das in Wasser fast unlösliche freie Caseïn nicht länger gelöst bleiben kann.

In der zweiten Auflage seines Lehrbuches der physiologischen Chemie (Leipzig 1853) sagt Lehmann[1]) von den Säuren, dass sie den

[1]) Jos. Scherer: Chemisch-physiologische Untersuchungen. Annal. d. Ch. und Ph. Bd. 40. 1841.

[2]) Friedrich Rochleder: Beiträge zur Kenntniss des Käsestoffs. Annal. d. Ch. und Ph. Bd. 45. 1843.

[3]) C. G. Lehmann: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 2. Auflage (zweite Umarbeitung). Leipzig 1853.

Käsestoff aus wässriger Lösung fällen und zum Theil damit sich verbinden; doch soll das mit Milchsäure oder Essigsäure gefällte Caseïn nicht milchsaures, sondern reines Caseïn sein. In der nach dieser Zeit erschienenen deutschen Literatur habe ich keine Angaben gefunden, welche für die ältere Ansicht sprechen; und wenn ich nicht irre, möchte wohl auch unter den deutschen Chemikern gegenwärtig (insoweit es nicht um das Ausfällen des Caseïns durch Mineralsäuren in grösserem Ueberschusse sich handelt) die ROCHLEDER'sche Ansicht die vorherrschende sein.

In der französischen Literatur finden sich dagegen Angaben, welche mit dieser Ansicht nicht zu vereinbaren sind. DENIS behauptet in einer im Jahre 1856 erschienenen Abhandlung[1]), dass das Caseïn mit der zur Ausfällung benutzten Säure sich verbinden könne, und er gab sogar bestimmte Unterscheidungsmerkmale zwischen dem freien und dem mit Säuren chemisch verbundenen Caseïn an.

DENIS löste das mit Magnesiumsulfat ausgefällte Caseïn in Wasser und entfernte die Fettkügelchen durch Filtration. Wenn dies vollständig gelungen war, verdünnte er das durchsichtige, nur schwach opalisirende Filtrat mit dem 20-fachen Volumen Wasser und setzte dieser verdünnten Lösung tropfenweise eine höchst verdünnte Salzsäure (von nur 0,1 % HCl.) zu, bis ein ausserordentlich feiner, kaum sichtbarer, nur sehr langsam zum Boden sinkender Niederschlag entstand. Dieser, in Neutralsalzen leicht lösliche Niederschlag ist nach DENIS reines Caseïn. Setzt man dagegen so viel Säure zu, dass ein aus grösseren Caseïnkörnchen bestehender, rasch zum Boden sinkender Niederschlag entsteht, so erhält man nicht mehr das reine Caseïn sondern eine Verbindung zwischen Caseïn und Säure. Diese Verbindung unterscheidet sich von dem reinen Caseïn durch Unlöslichkeit in Neutralsalzen; und wenn diese Angaben richtig sind würde also das gewöhnliche Caseïn, wie es in den Handbüchern beschrieben wird, eine Verbindung mit der zur Fällung benutzten Säure sein. Das gewöhnliche Caseïn soll nämlich in Neutralsalzen unlöslich sein.[2])

---

[1]) P. S. DENIS (de Commercy): Nouvelles études chimiques, physiologiques et médicales sur les substances albuminoïdes etc. Paris 1856.

[2]) Vergl. HOPPE-SEYLER: Handbuch der physiologisch und pathologisch chemischen Analyse. 4. Auflage.

Mit den Angaben von Denis stimmen die von Millon & Commaille [1]) ausgeführten Untersuchungen in so weit überein, als diese Forscher Verbindungen von Caseïn mit verschiedenen Säuren dargestellt und analysirt haben wollen. Millon & Commaille behaupten nämlich Verbindungen von Caseïn mit Chlorwasserstoffsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Oxalsäure, Phosphorsäure, Arsensäure und Chromsäure erhalten zu haben, und für diese Verbindungen haben sie auch Formeln aufgestellt. Die Angaben dieser Forscher stehen also — vorausgesetzt, dass diese Angaben auf das gewöhnliche mit Säuren niedergeschlagene Caseïn sich beziehen — im grellsten Widerspruche mit den Angaben von Scherer [2]) und Rochleder [3]), und es ist desshalb nöthig, die Untersuchungen von Millon & Commaille etwas eingehender zu besprechen.

Wenn man die Milch oder eine Caseïnlösung mit einer Mineralsäure wie Schwefel- oder Chlorwasserstoffsäure versetzt, entsteht bekanntlich ein Niederschlag, welcher besonders bei Anwendung von Chlorwasserstoffsäure leicht von einem kleinen Ueberschusse des Fällungsmittels wieder aufgelöst wird. Setzt man dieser sauren Caseïnlösung noch mehr Säure zu, so entsteht, sobald eine genügende Säuremenge zugesetzt worden ist, ein zweiter Niederschlag von gefälltem Caseïn. Dieser zweite Niederschlag ist wahrscheinlich — wie die älteren Forscher, welchen dieses Verhalten nicht entgangen war, meinten — eine Verbindung zwischen Caseïn und Säure; aber sei dem wie ihm wolle, unter allen Umständen ist es wohl klar, dass die Entstehung dieser beiden Caseïnniederschläge nicht auf dieselbe Ursache zurückgeführt werden könnte. Die erste Caseïnfällung rührt wohl wenigstens in erster Hand daher, dass dem Caseïn durch die zugesetzte Säure die zu dessen Lösung nöthigen Alkalien und Erden entzogen werden; die zweite Fällung rührt daher, dass der in überschüssiger Säure gelöste Käsestoff durch einen noch grösseren Säureüberschuss wiederum gefällt wird. Ich weiss nicht, ob dieses Verhalten den Herren Millon & Commaille zur Zeit der Ausführung ihrer Untersuchungen bekannt war, aber jedenfalls wird es in der genannten Abhandlung von ihnen nicht erwähnt.

Während es ganz unzweifelhaft ist, dass Scherer und Rochleder wie auch die anderen oben citirten Autoren nur den ersten Caseïnnieder-

---

[1]) E. Millon & A. Commaille. De l'affinité de la Caséine pour les acides, et des composés qui en résultent. Comptes rendus. Tom. 60. 1865.

[2]) A. a. O.

[3]) A. a. O.

schlag untersucht haben, ist es nicht gleich leicht mit Bestimmtheit zu sagen, welche von den beiden Caseïnfällungen von MILLON & COMMAILLE. untersucht worden sei. Es ist dies um so schwieriger, als in der oft genannten Abhandlung keine Angaben über die Menge und Stärke der benutzten Säure zu finden sind. Die Verfasser setzen nicht die verdünnte Säure zu der Lösung von Caseïn in kohlensaurem Natron, sondern sie setzen umgekehrt die Caseïnlösung zu der vorher verdünnten Säure, und da, wie ich wenigstens bei Versuchen mit Salzsäure gesehen habe, der zweite Caseïnniederschlag schon bei Anwesenheit von nur etwa 2% freie Säure entstehen kann, muss die Natur des entstandenen Niederschlages wesentlich von der Menge und dem Verdünnungsgrade der angewendeten Säure abhängig sein.

Es ist also nicht leicht mit Bestimmtheit zu sagen, ob MILLON & COMMAILLE den ersten oder zweiten Caseïnniederschlag analysirt haben[1]); aber wenn ich nicht irre, müssen doch auch ihre Untersuchungen auf den ersten Caseïnniederschlag sich beziehen.

Die Gründe, welche mich zu diesem Schlusse geführt haben, sind erstens die Angaben der Verff. über die Löslichkeit des Caseïnniederschlages in überschüssiger Säure und zweitens die von ihnen angewendete Methode zur Reindarstellung des Caseïns.

Die Verfasser sprechen wiederholt von der Leichtlöslichkeit des von ihnen mit Säuren erhaltenen Caseïnniederschlages in überschüssiger Säure und sie heben dabei besonders die Leichtlöslichkeit in überschüssiger Salzsäure hervor. Diese Angaben passen unzweifelhaft viel besser auf den ersten wie auf den zweiten Caseïnniederschlag, denn während jener in Säuren, besonders Chlorwasserstoffsäure, ungemein leicht löslich ist, löst sich dieser nur sehr schwierig und erst in einem grossen Ueberschusse der Säure auf.

Bezüglich der Reingewinnung des Caseïns sagen die Verfasser, dass sie den Caseïnniederschlag durch wiederholtes Auspressen und Vertheilen in Wasser gereinigt haben, und auch diese Angabe passt besser auf den ersten Caseïnniederschlag. Der zweite Caseïnniederschlag (meine Angaben beziehen sich auf das mit Chlorwasserstoffsäure gefällte Caseïn) quillt nämlich, wenn man ihn in Wasser vertheilt, zu einer gallert-

[1]) Selbstverständlich kann eine solche Schwierigkeit nur in Bezug auf diejenigen Säuren entstehen, welche — wie die Salzsäure, Salpetersäure u. s. w. — 2 verschiedenartige Caseïnniederschläge geben können. Für andere Säuren — wie Essigsäure — kann ein Zweifel über die Natur des analysirten Niederschlages nicht bestehen.

ähnlichen oder kleisterartigen Masse auf, die kaum auszupressen ist und die, wenn man ihr die nöthige Zeit lässt, allmählich aufgelöst wird. Es ist also kaum möglich, den zweiten Caseïnniederschlag nach der von M & C angewandten Methode zu reinigen, während dies ohne Schwierigkeit mit dem ersten Niederschlage gelingt; und wenn ich diesen Umstand mit der Angabe der Verfasser über die Löslichkeit des Niederschlages in überschüssiger Säure zusammenhalte, muss ich also den Schluss ziehen, dass auch die Untersuchungen von M & C auf den gewöhnlichen, mit Säure erhaltenen, ersten Caseïnniederschlag sich beziehen.

Wie aus dem Obigen zu ersehen ist, stehen also die Ansichten der Forscher über die Natur des mit Säuren erhaltenen Caseïnniederschlages im grellsten Widerspruche mit einander. Sehen wir von den ältesten Angaben ab., so finden wir nämlich auf der einen Seite Scherer und Rochleder, welche die Annahme von einer chemischen Verbindung zwischen dem gefällten Caseïn und der zur Fällung benutzten Säure entschieden bekämpfen, und auf der anderen Seite Millon & Commaille, welche umgekehrt die Richtigkeit einer solchen Annahme beweisen wollen. Es ist nun gewiss im Allgemeinen keine leichte Aufgabe zwischen zwei entgegengesetzten Ansichten eine richtige Wahl zu machen, und in diesem speciellen Falle dürfte dies sogar unmöglich sein, denn die von beiden Seiten beigebrachten Gründe sind, nach meiner Ansicht, nicht strenge beweisend.

Scherer und Rochleder konnten, wie oben gesagt wurde, bei der elementaranalytischen Untersuchung keinen wesentlichen Unterschied in dem Kohlen-, Wasserstoff- und Stickstoffgehalte des auf verschiedene Weise dargestellten Caseïns nachweisen. Aus dieser Beobachtung zogen sie den Schluss, dass das mit Säuren gefällte Caseïn keine Verbindung mit der Säure sei; aber bevor man einem solchen Schlusse beistimmt, ist es auch nöthig erst zu zeigen, dass die elementaranalytische Bestimmung des Kohlen-, Wasserstoff- und Stickstoffgehaltes eine für die Lösung dieser Frage brauchbare Methode ist. Nach meiner Ansicht dürfte dies nicht der Fall sein, und um diese meine Ansicht zu begründen, sei es mir gestattet, die Aufmerksamkeit des Lesers auf folgende Beobachtungen und Erwägungen zu lenken.

Der in Wasser fast unlösliche Käsestoff löst sich leicht nach Zusatz von Alkalien oder alkalischen Erden; und für die Möglichkeit, durch elementaranalytische Bestimmung des Kohlenstoff-, Stickstoff- und Wasserstoffgehaltes zu entscheiden, ob das Caseïn dabei eine chemische Verbindung mit dem Alkali, resp. der alkalischen Erde eingehe, muss selbst-

verständlich die Menge der zur Lösung erforderlichen Base von grosser Bedeutung sein. Es ist folglich nicht ohne Interesse, die zur Lösung des Caseïns erforderliche Menge eines Alkalis oder einer alkalischen Erde zu bestimmen, und ich habe desshalb auch in einigen Fällen die caseïnlösende Fähigkeit des Kalkes zu bestimmen versucht.

Ich verfuhr dabei in der Weise, dass ich ein möglichst reines Caseïn in wenig Kalkwasser löste und den überschüssigen Kalk durch Dialyse zu entfernen mich bemühte. Wegen der Befürchtung, dass die Caseïnlösung allmählich in Fäulniss übergehen würde, wagte ich es nicht, die Dialyse mehr als einige Tage fortzusetzen, und stets wurde der Versuch beendet, bevor ich noch ganz kalkfreie Diffusate erhalten hatte. Zwar konnten bei sehr häufigem Wechseln der Diffusate in den letzteren (wenn sie gesondert eingeengt wurden) zuletzt keine Spuren von Kalk mit Sicherheit nachgewiesen werden, aber selbst wenn dieser Punkt erreicht worden war, konnte ich in denjenigen Diffusaten, welche im Laufe von einer Nacht nicht gewechselt worden waren, die Anwesenheit von Kalk mit Leichtigkeit constatiren.

Der Umstand, dass in diesen Versuchen die Diffusate nie kalkfrei zu erhalten waren, während von der Caseïnkalkverbindung selbst nicht die geringsten Spuren durch das von mir benutzte Pergamentpapier diffundirten, macht es sehr wahrscheinlich, dass ich den Ueberschuss von Kalk nicht gänzlich durch Dialyse entfernt hatte, und dass dem entsprechend auch die zur Lösung des Caseïns erforderliche Kalkmenge etwas zu gross gefunden worden ist.

Nach beendeter Dialyse wurden die Caseïnlösungen[1]) filtrirt und in einer Platinschale allmählich zur Trockne verdunstet. Der bei 115° C. getrocknete, gewogene Rückstand wurde eingeäschert, der Kalk mit Oxalsäure gefällt und endlich durch Titration mit Chamäleon bestimmt. Die Menge des so gefundenen Kalkes betrug, auf das bei 115° getrocknete Caseïn bezogen, meistens weniger wie 1%, und zwar fand ich in den verschiedenen Versuchen 0,8—1,2% CaO.

Zur Lösung von 1 Gm. Caseïn in Wasser sind also 0,008 Gm. CaO völlig genügend, und diese Menge ist eine so kleine, dass der durch sie bedingten Veränderung in dem elementaranalytisch gefundenen Kohlen-

[1]) Da ich zu jeder Einäscherung nicht weniger wie 2—3 Gm. getrocknetes Caseïn brauchen wollte, war es nöthig, von der Caseïnlösung ziemlich grosse Mengen in Arbeit zu nehmen, und ich musste desshalb die Flüssigkeit auf 2—3 Dialysatoren vertheilen.

stoff-, Wasserstoff und Stickstoffgehalte keine Beweiskraft zuerkannt werden könnte. So würden z. B. das reine und das kalkhaltige Caseïn in Bezug auf den Kohlenstoffgehalt kaum grössere Unterschiede zeigen als diejenigen, welche die Elementaranalysen eines und desselben Eiweissstoffes oft aufzuweisen haben. Eben so wenig wie die eben angegebene Kalkmenge würde die äquivalente Menge Natron eine wesentliche Veränderung des Kohlenstoffgehaltes herbeiführen, und zwei Caseïnpräparate, welche equivalente Mengen von Calcium und Natrium enthielten, würden fast absolut dieselbe elementäre Zusammensetzung zeigen. Trotz einer solchen Uebereinstimmung in der elementären Zusammensetzung würde es doch kaum möglich sein zu bezweifeln, dass der Käsestoff chemische Verbindungen mit dem Alkali oder dem Kalke eingeht.

Wenn die von Millon & Commaille für die Verbindungen des Caseïns mit Säuren aufgestellten Formeln richtig wären, würde das chlorwasserstoffsaure Caseïn 3,1 % Chlorwasserstoffsäure, das Caseïnsulfat 3,3 % Schwefelsäure und das Caseïnnitrat 4,3 % Salpetersäure enthalten. Das salzsaure und schwefelsaure Caseïn müssen also — die Richtigkeit der gegebenen Formeln vorausgesetzt — fast absolut denselben Kohlenstoffgehalt besitzen, und sogar der Unterschied, welcher bezüglich dieses Elementes zwischen dem salzsauren und dem salpetersauren Caseïn bestehen muss, liegt innerhalb der bei Analysen von Eiweissstoffen oft beobachteten Schwankungen.

Es könnte also der Schluss, dass der Käsestoff mit der zur Fällung benutzten Säure sich chemisch nicht verbinde, erst dann aus einer ziemlich constanten Kohlenstoff-, Stickstoff- und Wasserstoffgehalte gezogen werden, wenn es sich zeigen würde, dass die elementäre Zusammensetzung auch bei Versuchen mit verschiedenen Säuren von sehr ungleichem Equivalentgewichte unverändert bliebe. Ich kann folglich den wenigen, von Scherer ausgeführten Analysen keine volle Beweiskraft zumessen, um so weniger als es fraglich bleibt, in wie weit in seinen Versuchen die Fällung des Caseïns durch die zugesetzte Säure oder durch das gebildete, saure Phosphat hervorgebracht wurde.

Gegen die Ansicht von einer Verbindung des Caseïns mit der zur Fällung benutzten Säure sprechen scheinbar weit mehr die Versuche von Rochleder, aber selbst diese Versuche dürften doch nicht strenge beweisend sein. Rochleder konnte zwar das mit Schwefelsäure gefällte Caseïn durch Waschen mit Wasser vollständig von Schwefelsäure befreien; aber um dies zu erreichen, musste er das gefällte Caseïn 15—20 Mal mit der 60—70-fachen Menge destillirten Wassers zum Kochen er-

hitzen. Es ist nun sehr fraglich, ob der so behandelte Käsestoff noch als ein typisches, in Bezug auf Löslichkeit, Fällbarkeit und Gerinnungsfähigkeit unverändertes Caseïn anzusehen sei. Meinestheils muss ich dies bezweifeln; und die Versuche von Rochleder beweisen also nach meiner Ansicht nicht ohne Weiteres, dass der durch Säuren gefällte, noch gerinnungsfähige und übrigens nicht nachweisbar veränderte Käsestoff keine chemische Verbindung mit der zur Fällung benutzten Säure ist.

Wenn also die Arbeiten von Scherer und Rochleder die Annahme von einer chemischen Verbindung zwischen Caseïn und Säure nicht bestimmt widerlegen, muss man doch andererseits auch zugeben, dass die Arbeiten von Millon & Commaille gar nicht in exacter Weise die Existenz solcher Verbindungen beweisen. Die letztgenannten Forscher haben nämlich für die Reinheit des analysirten Caseïns nicht in genügender Weise Sorge getragen.

Ich werde bei der Besprechung meiner eigenen Untersuchungen zeigen, wie ausserordentlich schwer es in der That ist, das Caseïn vollständig mit Wasser auszuwaschen; aber es wird gewiss auch ohne besondere Beweise ein jeder, der mit dem Caseïn gearbeitet hat, leicht finden dass das von Millon & Commaille behufs der Reinigung des Caseïns geübte Verfahren zu keinen sicheren Resultaten führen konnte. Die Verfasser haben nämlich das Caseïn, bevor es mit Alkohol und Aether behandelt wurde, nur durch 3 Mal wiederholtes Auspressen und Zertheilen oder Zerrühren in Wasser gereinigt, und es ist einleuchtend, dass in dieser Weise kein ganz reines Präparat erhalten werden konnte.

Wie aus dem oben Gesagten zu ersehen ist, musste ich also die Frage, ob das mit Säuren niedergeschlagene Caseïn mit der zur Fällung benutzten Säure chemisch sich verbinde, als eine offene bezeichnen, und bei dieser Sachlage schien es mir nicht unwichtig zu sein, diese Frage noch ein Mal zum Gegenstande einer experimentellen Untersuchung zu machen.

Bei diesen Untersuchungen schien es mir am besten zu sein, von der Schwefelsäure auszugehen. Es war nämlich zu erwarten, dass diese Säure ohne Schwierigkeit in der Lösung des Caseïns nachgewiesen werden könnte, und wenn dies nicht gelingen würde, blieb es noch übrig durch Schmelzen mit Kali und Salpeter den Schwefelgehalt des mit Schwefelsäure und anderen Säuren gefällten Caseïns zu bestimmen.

Der directe Nachweis von Schwefelsäure in der Lösung des mit Schwefelsäure gefällten Caseïns ist schon von Rochleder[1]) versucht

[1]) A. a. O.

worden. Er löste nämlich das Caseïn in überschüssiger Säure, setzte $BaCl_2$ zu und erhielt bei Versuchen mit dem durch Auskochen mit Wasser gereinigten, mit Schwefelsäure gefällten Caseïn nicht die Spur einer Fällung. Gegen dieses Verfahren kann nur die Einwendung erhoben werden, dass das Caseïn, welches bei neutraler oder alkalischer Reaction bedeutende Mengen von schwefelsaurem Baryt zu lösen vermag, vielleicht auch in saurer Lösung dieselbe Fähigkeit besitze; und bevor ich zu der eigentlichen Untersuchung ging, musste ich also zuerst die Empfindlichkeit und Brauchbarkeit der von Rochleder angewandten Methode besonders prüfen.

Ich verfuhr dabei in der Weise, dass ich neutrale oder schwach saure, ganz reine und nicht zu concentrirte Caseïnlösungen vorsichtig mit reiner, verdünnter Chlorwasserstoffsäure versetzte, bis der erste Caseïnniederschlag sich wieder gelöst hatte und eine nur sehr schwach opalisirende Lösung erhalten worden war. Um eine solche Lösung zu erhalten, muss man genau darauf achten, dass einerseits die Caseïnlösungen nicht zu concentrirt sind, weil widrigenfalls das Ganze binnen einiger Zeit zu einer Gallerte erstarren kann, und andererseits, dass nicht zu viel Säure zugesetzt wird. Bei Zusatz von zu viel Säure wird nämlich die Lösung, auch wenn kein bleibender Niederschlag sogleich entsteht, allmählich stärker opalisirend oder trübe und für den Nachweis von Spuren von Baryumsulfat nicht mehr brauchbar. Von der salzsauren, möglichst klaren Caseïnlösung wurde ein Theil mit einer sehr geringen Menge einer titrirten Schwefelsäure versetzt, während der Rest zur Controle aufbewahrt wurde. Bei Zusatz von $BaCl_2$ entstand ohne Ausnahme in beiden Proben ein — wenn nicht zu viel $BaCl_2$ zugesetzt worden war — beim Umrühren sogleich verschwindender Niederschlag, welcher allem Anscheine nach daher rührte, dass das $BaCl_2$ wie andere Salze das Caseïn aus stark saurer Lösung fällt. Nach dem Verschwinden dieses Niederschlages in Folge der Umrührung blieb die schwefelsäurefreie Controleprobe während 24 Stunden oder einer noch längeren Zeit ganz unverändert, während in der mit Schwefelsäure versetzten Probe innerhalb einiger Secunden eine je nach der Menge der zugesetzten Säure weisslich schillernde oder stärkere Trübung von Baryumsulfut entstand. Das Caseïn hat also nicht die Fähigkeit nennenswerthe Mengen von Baryumsulfat in saurer Flüssigkeit in Lösung zu halten, und es können im Gegentheil sogar sehr kleine Mengen von Schwefelsäure in der salzsauren Caseïnlösung mit $BaCl_2$ direct nachgewiesen werden. Um die Braubarkeit dieses Ver-

fahrens zu zeigen, mag es mir erlaubt sein, unter den von mir ausgeführten Versuchen hier einen einzigen als Beispiel anzuführen.

Eine nicht näher bestimmte Menge eines mit Essigsäure 3 Mal gefällten, durch wiederholtes Zerreiben unter Wasser gewaschenen, noch feuchten Caseïns wurde in Wasser durch Zusatz von möglichst wenig Alkali zu einer schwach sauren Flüssigkeit gelöst. Ein genau abgemessener Theil dieser Lösung, in einer Platinschale verdunstet und bei 110^0 C getrocknet, gab 2,24 $^0/_0$ Rückstand, welcher, da man die darin enthalten nicht genau wägbaren Spuren von Alkali unberücksichtigt lassen kann, ohne wesentlichen Fehler als nur aus Caseïn bestehend angesehen werden darf. Nachdem von dieser Caseïnlösung 200 Cc. mit der zur Fällung des Caseïns und Wiederauflösung desselben erforderlichen Menge einer reinen, schwefelsäurefreien Chlorwasserstoffsäure versetzt worden waren, wurde die Lösung von Neuem gemessen und in 4 gleich grosse Theile (von denen also ein jeder 50 Cc. der ursprünglichen Lösung entsprach) getheilt. Von diesen 4 Theilen wurde einer *a* zur Controle aufbewahrt, während die 3 übrigen *b*, *c* und *d* mit resp. 1 Cc., 0,5 Cc. und 0,2 Cc. einer Zehntelnormalschwefelsäure versetzt wurden. Bei Zusatz von $BaCl_2$ entstand in allen 4 Proben der gewöhnliche, bei Umrühren verschwindende Niederschlag, aber während die Controleprobe *a* nach dem Verschwinden dieses Niederschlages vollkommen durchsichtig blieb und nur die gewöhnliche, schwach bläuliche Opalescens zeigte, entstand in den übrigen 3 Proben ein stärkerer oder schwächerer Niederschlag von schwefelsaurem Baryt, der noch in der Probe *d* als eine weisslich schillernde Trübung deutlich zu sehen war. Im Laufe der Nacht hatten die 3 letztgenannten Proben sich geklärt, aber selbst in der Probe *d* war auf dem Boden des Gefässes ein weisslicher Beschlag von Baryumsulfat zu sehen, während in der Controleprobe keine Spur einer in der Flüssigkeit vorhandenen Trübung oder eines am Boden haftenden Beschlages sichtbar war. In der Probe *d*, welche mehr als 1 Gm. Caseïn enthielt, konnten also 0,0008 Gm. Schwefelsäure mit Sicherheit direct nachgewiesen werden, und doch ist damit die Grenze noch nicht erreicht. Die Brauchbarkeit dieses Verfahrens ist nämlich so gross, dass die unbedeutenden Schwefelsäuremengen, welche bei dem Auflösen des Caseïns in einer nicht ganz schwefelsäurefreien Natronlauge die Caseïnlösung verunreinigen, dadurch nachgewiesen werden können.

Die einzige Schwierigkeit liegt vielleicht in der Darstellung von einer genügend klaren und durchsichtigen Lösung von Caseïn in überschüssiger Chlorwasserstoffsäure, aber wem diese Schwierigkeit zu gross

erscheint, der kann auch so verfahren, dass er den Käsestoff mit überschüssiger Chlorwasserstoffsäure fällt und das klare Filtrat mit $BaCl_2$ auf Schwefelsäure prüft. Bei diesem Verfahren, welches unzweifelhaft viel leichter ausführbar ist, kann zwar ein Theil der Schwefelsäure von dem gefällten Caseïn mit niedergerissen werden und folglich auch verloren gehen, aber die Brauchbarkeit auch dieses Verfahrens ist nichtsdestoweniger so gross, dass ich in 50 Cc. einer Lösung, welche 4 % Caseïn und 0,004 % Schwefelsäure enthielt, die letztere ohne Schwierigkeit und mit genügender Sicherheit in der von dem Caseïn abfiltrirten klaren Flüssigkeit nachweisen konnte. In diesem Falle waren also 2 Gm. Caseïn von nur 0,002 Gm. Schwefelsäure verunreinigt, und dennoch konnte diese sehr geringfügige Verunreinigung ohne Schwierigkeit nachgewiesen werden. Ich habe übrigens zu wiederholten Malen solche Versuche ausgeführt, und ich habe mich dabei leicht überzeugen können, dass durch das obige Verfahren Schwefelsäuremengen mit Leichtigkeit direct nachgewiesen werden können, die durch eine Elementaranalyse gar nicht mit Sicherheit zu entdecken sein würden.

Nachdem ich die Brauchbarkeit des von mir zum Nachweis von Schwefelsäure in dem Caseïn benutzten Verfahrens genügend besprochen habe, kann ich zu den Versuchen selbst übergehen. Bei der Ausführung dieser Versuche ging ich von den folgenden Erwägungen aus.

Wenn es sich darum handelt, das Caseïn mit Schwefelsäure zu fällen, ist es kaum räthlich, von der Milch direct auszugehen. Bei Zusatz von Schwefelsäure zu der Milch entsteht nämlich zwar ein Niederschlag von Caseïn, aber dieser Niederschlag wird von einer nicht zu vernachlässigenden Menge von mitgefälltem, schwer zu entfernendem Calciumsulfat verunreinigt. Wenn nun dieses, von Calciumsulfat verunreinigte Caseïn behufs einer weiteren Reinigung durch Zusatz von Alkali in Wasser gelöst wird, so löst sich — wegen der Fähigkeit des Caseïns grosse Mengen von Calciumsulfat in neutraler oder alkalischer Flüssigkeit in Lösung zu halten — dabei auch das gefällte Calciumsulfat auf, um bei dem nächsten Zusatze von Säure wieder von dem gefällten Caseïn mit niedergerissen zu werden. Wegen der Schwierigkeit, das Calciumsulfat durch Waschen mit Wasser vollständig zu entfernen, fand ich es desshalb nöthig, das Caseïn aus der Milch mit einer anderen Säure auszufällen und erst von diesem, durch wiederholtes Auflösen und Ausfällen von Mineralbestandtheilen gereinigten Caseïn auszugehen.

Wenn nun, wie dies von mehreren Forschern behauptet worden ist, das mit Säuren gefällte Caseïn eine chemische Verbindung mit der

zur Fällung benutzten Säure eingingc, würden, wenn zur Ausfällung des Caseïns eine andere Säure als die Schwefelsäure benutzt worden, vielleicht dadurch neue Schwierigkeiten entstehen. Wenn man z. B. das mit Essigsäure gefällte, sonst reine (essigsaure) Caseïn in Wasser durch Zusatz von ein wenig Alkali löst, so muss man selbstverständlich in der Lösung nicht nur Alkalicaseat, sondern auch Alkaliacetat erhalten. Setzt man zu dieser Lösung die zur Fällung des Caseïns nöthige Menge Schwefelsäure, so ist es sehr wohl möglich, dass das Caseïn nicht als eine Verbindung mit der Schwefelsäure, sondern vielmehr als eine Verbindung mit der, durch die Schwefelsäure frei gemachten schwächeren Säure (Essigsäure) sich ausscheide. Die Abwesenheit von Schwefelsäure in dem Niederschlage würde also in diesem Falle zu irrigen Schlüssen führen.

Von diesen Erwägungen ausgehend, verfuhr ich in diesen Versuchen in folgender Weise. Aus der mit 4 Vol. Wasser verdünnten Milch schlug ich das Caseïn mit Chlorwasserstoffsäure nieder, wusch den Niederschlag mit Wasser aus, löste ihn in möglichst wenig Alkali und fällte wiederum mit Chlorwasserstoffsäure. Nachdem ich dieses Verfahren 3 Mal wiederholt hatte, löste ich das zum dritten Male gefällte Caseïn in Wasser durch Zusatz von so wenig Alkali (Natron), dass eine nur äusserst schwach alkalisch reagirende Lösung erhalten wurde. Aus dieser Lösung wurde durch Dialyse das Chlornatrium möglichst vollständig entfernt, was bei fleissigem Wechseln der Diffusate gewöhnlich im Laufe von 2 Tagen gelang. Erst wenn die Caseïnlösung in dieser Weise gereinigt worden war, wurde sie mit Schwefelsäure gefällt.

Der mit Schwefelsäure erhaltene Niederschlag wurde erst durch Decantation mit Wasser gewaschen und dann mit Wasser fein zusammengerieben, bis das Ganze einer feinen Emulsion ähnlich wurde. Wegen der Feinheit des so zerriebenen Caseïns und der Langsamkeit, mit welcher sich die Caseïnpartikelchen zum Boden setzen, konnte die Decantation nicht ohne sehr grosse Verluste weiter angewendet werden, und ich musste also den Caseïnniederschlag auf Filtren sammeln und mit Wasser auswaschen. Dabei wurde das Waschwasser von Zeit zu Zeit mit $BaCl_2$ auf Schwefelsäure und mit Gerbsäure auf Eiweiss (Caseïn) geprüft.

Trotzdem, dass ich den Rückstand auf den Filtren 2—3 Mal täglich unter Wasser möglichst fein zerrieb, um ganz sicher zu sein, dass keine grösseren, mit dem Wasser nicht auszuwaschenden Caseïnkörner zurückgeblieben waren, war es mir in dem ersten Versuche nicht möglich, durch 3-tägiges Waschen mit Wasser ein absolut schwefelsäure-

und eiweissfreies Filtrat zu erhalten. Erst nachdem ich das Waschen 4 Tage fortgesetzt hatte, war das Filtrat schwefelsäurefrei geworden, während ich mit Gerbsäure nur bei umsichtiger Arbeit Spuren von Caseïn nachweisen konnte. In einem zweiten Versuche musste ich das Auswaschen 5 Tage fortsetzen, bevor ich ein ganz schwefelsäurefreies Filtrat erhielt, und in anderen Versuchen schwankte die zum vollständigen Auswaschen nöthige Zeit zwischen 2 und 6 Tagen. Diese Schwankungen rühren daher, dass ich in den verschiedenen Versuchen nicht gleich grosse Caseïnmengen auf die Filtren brachte. Die Geschwindigkeit, mit welcher das Auswaschen des Caseïns geschehen kann, ist nämlich selbstverständlich sehr abhängig von der Menge des auf jedem Filtrum auszuwaschenden Caseïns, und in einem anderen Versuche, in welchem ich nur wenig Caseïn auf jedes Filtrum brachte, gelang es mir auch im Laufe von einem Tage, wobei ich doch das Zerreiben 4 Mal wiederholte, ein ganz schwefelsäurefreies Filtrat zu erhalten. Es ist desshalb auch, wenn man solche Versuche ausführen will, dringend geboten, nur sehr kleine Caseïnmengen auf je ein Filtrum zu bringen, damit das Auswaschen möglichst bald beendet werde.

Uebrigens kann, wenn das Waschwasser rasch durchläuft, die Verunreinigung des letzteren mit Schwefelsäure eine so unbedeutende werden, dass man leicht verleitet werden kann, mit dem Auswaschen des Niederschlages nicht weiter fortzufahren. Wenn man in diesem Falle den Niederschlag vom Filtrum nimmt, mit Wasser fein zerreibt und auf ein neues Filtrum bringt, so ist es oft leicht in dem neuen Filtrate etwas Schwefelsäure nachzuweisen, und ich betrachte desshalb auch das Auswaschen erst dann als beendet, wenn nach einem neuen Zerreiben das nach einiger Zeit abfiltrirte Waschwasser gar keine Schwefelsäurereaction mehr giebt.

Es ist also, wie ich schon oben bemerkt habe, sehr schwierig, das Caseïn mit Wasser vollständig auszuwaschen, und man muss dabei befürchten, dass das Caseïn während der zu dem Auswaschen nöthigen, bisweilen sehr langen Zeit in Fäulniss übergehen oder in irgend einer anderen Weise sich verändern werde. In meinen Versuchen, welche bei niedriger Lufttemperatur ausgeführt wurden und in welchen das auf Filtren gesammelte Caseïn über die Nächte in einem kühlen Keller aufbewahrt wurde, konnte ich indessen, wenn das Auswaschen nicht über 4—5 Tage fortgesetzt wurde, keine Zeichen von beginnender Fäulniss beobachten. Wenn man auf jedes Filtrum nur eine so kleine Caseïn-

menge bringt, dass das Auswaschen im Laufe von 1—2 Tagen beendet wird, kann man übrigens in dieser Hinsicht ganz sicher sein.

Dass der Käsestoff durch ein sehr langdauerndes Auswaschen auch in Bezug auf Löslichkeit und Gerinnbarkeit eine Veränderung erleiden kann, ist zwar unzweifelhaft, aber es ist doch — was ich schon oben hervorgehoben habe — sehr bemerkenswerth, dass in dieser Hinsicht ein Aufbewahren unter viel Wasser weit schädlicher als ein Aufbewahren auf Filtren wirkt. Während schon das Stehen unter Wasser 24 Stunden oder über eine Nacht nach den Erfahrungen von Al. Schmidt[1]) und mir nachtheilig wirken kann, habe ich das Auswaschen des Caseïns auf Filtren 2—3 Tage ohne nachtheilige Folgen fortsetzen können. Für die unveränderte Beschaffenheit des so behandelten Caseïns werde ich bald die Beweise bringen.

Es ist also sehr gut möglich, das mit Schwefelsäure gefällte Caseïn so vollständig auszuwaschen, dass in dem Waschwasser keine Spuren von Schwefelsäure zu finden sind, und es fragt sich also, ob das so weit gereinigte Caseïn ein schwefelsäurefreies oder schwefelsäurehaltiges sei. Um dies zu entscheiden, verfuhr ich in der oben, pag. 23, angegebenen Weise, und da sämmtliche Versuche dasselbe Resultat gegeben haben, will ich nur, damit der Leser die Reinheit des Präparates besser beurtheilen könne, als Beispiele die folgenden Versuche anführen.

Ein während 3 Tage bis zum Erhalten eines ganz schwefelsäurefreien Waschwassers ausgewaschenes Caseïn wurde in Wasser fein zerrieben und durch Zusatz von einer nicht weiter bestimmten Menge eines schwefelsäurefreien Kaliumcarbonats gelöst. Von dieser Lösung wurden 10 Cc. in einer Platinschale eingetrocknet, der bei 110^0 C. getrocknete Rückstand gewogen und eingeäschert. Nach Abzug von der Asche, deren Menge nur 0,0045 Gm. betrug, war das Gewicht des getrockneten Rückstandes 0,322 Gm., und die Lösung enthielt also etwa 3,22 % Caseïn. Von den noch rückständigen 27 Cc. dieser Lösung wurden 25 Cc. abgemessen, mit der passenden Menge Chlorwasserstoffsäure und dann mit $BaCl_2$ versetzt. Nach dem Umrühren war die Flüssigkeit nur schwach bläulich opalisirend und vollkommen durchsichtig ohne Spuren einer weisslichen Trübung, und nachdem sie ohne sich merkbar zu verändern über eine Nacht gestanden hatte, wurde sie am folgenden Tage der Controle halber mit 1 Cc. einer $^1/_{100}$ Normalschwefelsäure versetzt. Es entstand nun innerhalb einiger Secunden eine ziemlich

[1]) Pflügers Archiv. Bd. 11, pag. 41.

stark weisslich schillernde Trübung von schwefelsaurem Baryt. Nach 12 Stunden hatte sich die Flüssigkeit geklärt und am Boden des Becherglases war ein dünner weisslicher Beschlag von Baryumsulfat zu sehen.

In den ursprünglichen 25 Cc. waren in diesem Falle also 0,8 Gm. Caseïn enthalten, und eine absichtliche Verunreinigung mit 0,0004 Gm. Schwefelsäure war noch leicht zu constatiren. Da in diesem Falle vor dem Zusatze von Schwefelsäure gar keine Reaction mit $BaCl_2$ zu erhalten war, sehe ich mich zu dem Schlusse berechtigt, dass in dem untersuchten Caseïn höchstens nicht sicher nachweisbare Spuren von Schwefelsäure vorhanden sein konnten.

In einem anderen Versuche, in welchem ich 3 Gm. erst mit Wasser ausgewaschenes und dann mit Alkohol-Aether behandeltes Caseïn mit Hülfe von ein wenig Alkali in 50 Cc. Wasser löste und die Flüssigkeit in 2 gleich grosse Portionen theilte, konnte ich in der einen Probe nach dem Ausfällen des Caseïns mit Salzsäure in dem klaren Filtrate gar keine Schwefelsäurereaction mit $BaCl_2$ erhalten, während in der zweiten, absichtlich mit 0,0005 Gm. Schwefelsäure verunreinigten Probe diese Verunreinigung mit Leichtigkeit in dem Filtrate nachgewiesen werden konnte.

Wenn ich oben sagte, dass sämmtliche Versuche ein übereinstimmendes Resultat gegeben haben, soll dies nicht so verstanden werden, als ob ich nie Spuren von Schwefelsäure in dem ausgewaschenen Caseïn gefunden hätte. Im Gegentheil habe auch ich in dem Caseïn, welches, nach dem Verhalten des Waschwassers zu urtheilen, voraussichtlich als ein schwefelsäurefreies sich herausstellen würde, in einigen Fällen Spuren von dieser Säure nachweisen können, aber auch in diesen Fällen war es möglich, durch neues Zerreiben und Auswaschen das Präparat ganz schwefelsäurefrei zu erhalten. Die Uebereinstimmung der Resultate lag also darin, dass es mir in jedem Versuche ohne Ausnahme gelungen ist, die Schwefelsäure bei sorgfältiger Arbeit durch anhaltendes Auswaschen und wiederholtes Zerreiben vollständig zu entfernen. Es ist zwar dazu im Allgemeinen ein sehr anhaltendes Auswaschen erforderlich; aber wenn man das Caseïn wiederholt möglichst sorgfältig zerreibt und nur eine kleine Menge davon auf jedes Filtrum bringt, kann das Auswaschen in so kurzer Zeit vollendet werden, dass keine — wenigstens keine nachweisbare — Zersetzung dabei stattfindet.

Wenn es also möglich ist, durch Waschen mit Wasser die zur Fällung des Caseïns benutzte Säure aus dem Caseïnniederschlage zu entfernen, muss ich doch wegen der grossen Schwierigkeiten, mit wel-

chen dieses Entfernen der Säure verbunden ist, als etwas sehr Wahrscheinliches behaupten, dass das in üblicher Weise — sei es für qualitative oder quantitative Versuche — gefällte, ohne Zerreiben und ohne sehr anhaltendes Auswaschen gereinigte Caseïn kein ganz reiner Käsestoff sei.

Die Angaben von Berzelius [1]), Mulder [2]) und anderen Forschern dürften also in so weit richtig sein, als durch sie nur ausgesagt werden soll, dass der mit Säuren erzeugte, in üblicher Weise gereinigte Caseïnniederschlag nicht aus reinem Caseïn, sondern aus Caseïn und Säure bestehe. Die von diesen Forschern herrührende, aber vor Allem von Millon & Commaille scharf formulirte Ansicht von einer chemischen Verbindung des Caseïns mit der zur Fällung des Caseïns verwendeten Säure findet dagegen in meinen Beobachtungen keine Stütze. Es wäre zwar nicht unmöglich, dass das Caseïn mit Säuren Verbindungen einginge, welche — wie dies von Millon & Commaille für die angeblichen Verbindungen des Caseïns mit Essigsäure, Jodwasserstoffsäure, Rhodanwasserstoffsäure und Ueberchlorsäure behauptet worden ist — durch Waschen mit Wasser unter Abspaltung der Säure zersetzt werden, da aber der Schwefelsäuregehalt des Präparates während des Auswaschens stetig, bis zum gänzlichen Verschwinden sämmtlicher Säure, vermindert wird, kann man wenigstens nicht darauf rechnen, ein Präparat von constanter Zusammensetzung zu erhalten.

Die Thatsache, dass durch anhaltendes Auswaschen ein ganz säurefreies Caseïn zu gewinnen ist, lässt sich nach meiner Ansicht weit einfacher dadurch erklären, dass dem Caseïn wie anderen Eiweisskörpern in hohem grade die Eigenschaft zukomme, fremde Stoffe mechanisch mit niederzureissen und sehr hartnäckig festzuhalten. Hierzu kommt noch, dass die Eigenschaft des Caseïns harte Körnchen oder Klümpchen zu bilden, dem Einschliessen von etwas Mutterlauge, von der das Caseïn nur durch sehr feines Zerreiben und Auswaschen zu befreien ist, sehr günstig sein muss; und wenn ich auch nicht leugnen will, dass die Annahme von einer Verbindung des Caseïns mit der Säure gewisse Eigenthümlichkeiten dieses Stoffes gut erklären würde, muss ich also doch der Ansicht von Scherer und Rochleder beitreten.

Nachdem wir gesehen haben, mit wie vielen Schwierigkeiten ein vollständiges Auswaschen des Caseïns verbunden ist, wird man es hof-

---

[1]) A. a. O.

[1]) A. a. O.

fentlich berechtigt finden, wenn ich den sehr positiven Angaben von Millon & Commaille kein grosses Gewicht zumessen kann. Es ist nämlich offenbar, dass das von den genannten Forschern geübte, oben referirte Reinigungsverfahren so wenig brauchbare Resultate geben muss, dass, selbst wenn das Caseïn mit der zur Fällung benutzten Säure eine chemische Verbindung einginge, dies durch das von Millon & Commaille angewandte Verfahren nicht in exacter Weise zu beweisen sein würde. Uebrigens können die Angaben von Millon & Commaille nicht nur eben so leicht, sondern vielleicht noch leichter durch die Annahme von einer Verunreinigung des Caseïns mit der zur Fällung benutzten Säure erklärt werden. Um dies zu zeigen, erlaube ich mir, auf einige sehr wichtige Angaben der genannten Forscher die Aufmerksamkeit des Lesers hier zu lenken.

Nach Millon & Commaille soll die Verbindung des Caseïns mit einer Säure durch irgend eine andere, im Ueberschuss zugesetzte Säure zerlegt werden, und so soll beispielsweise das in Alkali gelöste Caseïnsulfat durch Salpetersäure derart zerlegt werden, dass man in dem Niederschlage Salpetersäure nachweisen kann, während das Filtrat etwas Schwefelsäure enthält. Es ist nun ganz unzweifelhaft, dass auch dasselbe Resultat mit Nothwendigkeit erhalten werden muss, wenn das Caseïn mit den Säuren nicht sich verbindet, sondern nur von ihnen verunreinigt wird. Es muss nämlich in dem letzteren Falle selbstverständlich die im Ueberschuss zugesetzte Säure in dem Niederschlage enthalten sein, während auch ein Theil von der ursprünglich vorhandenen Säure in Lösung bleiben muss. Ich sage absichtlich, dass nur ein Theil der ursprünglich vorhandenen Säure in das Filtrat übergehen muss, denn der neue Caseïnniederschlag enthält — was zu erwarten war und was übrigens auch Millon & Commaille nicht entgangen ist — die beiden Säuren. Die 2 Säuren vertheilen sich nämlich in diesem Falle auf Niederschlag und Flüssigkeit, eine Thatsache, von deren Richtigkeit man durch Versuche mit Schwefelsäure und Phosphorsäure sich leicht überzeugen kann.

Die von Millon & Commaille herrührende, von mir nur constatirte Beobachtung, dass der Caseïnniederschlag gleichzeitig Schwefelsäure und Phosphorsäure enthalten kann, betrachten die Verfasser als einen Beweis für die Fähigkeit des Caseïns gleichzeitig mit zwei Säuren sich chemisch zu verbinden. Meinestheils möchte ich doch eher diese Beobachtung als einen Beweis für die blosse Verunreinigung des Caseïns mit den Säuren betrachten. Ich finde es nämlich sehr natürlich, dass

eine Lösung, welche gleichzeitig Natriumcaseat und Phosphat enthält, wenn sie mit Schwefelsäure gefällt wird, einen nach unvollständiger Reinigung nicht nur von Schwefelsäure, sondern auch von Phosphorsäure verunreinigten Niederschlag geben soll. Ja es ist sogar möglich, Caseïnniederschläge zu erhalten, welche gleichzeitig nicht nur 2 sondern sogar 3—4 Säuren enthalten. Um dies zu zeigen, werde ich nur den folgenden Versuch anführen.

Ich löste eine nicht weiter bestimmte Menge eines ganz reinen Caseïns in Wasser mit Hülfe von ein wenig Alkali, und diese Lösung wurde darauf mit etwas Chlornatrium, Natriumphosphat und Ammoniumoxalat verunreinigt. Der durch Zusatz von Schwefelsäure erzeugte Niederschlag wurde genau nach der Vorschrift von Millon & Commaille (durch 3-maliges Zerreiben in Wasser und Auspressen) gereinigt und darauf in Wasser mit Hülfe von der nöthigen Menge eines ganz reinen Kaliumcarbonats gelöst. Die so gewonnene Caseïnlösung wurde gegen destillirtes Wasser dialysirt, und schon nach 12 Stunden konnten ohne vorhergegangene Concentration des Diffusates Spuren von Chlorwasserstoffsäure und Schwefelsäure darin nachgewiesen werden. Von Oxalsäure und Phosphorsäure waren dagegen keine direct nachweisbare Spuren vorhanden. Da das nie gewechselte Diffusat 24 Stunden später stark concentrirt wurde, konnten die 4 Säuren mit Leichtigkeit in dem ganz eiweissfreien Diffusate nachgewiesen werden. In diesem, genau nach Millons & Commailles Vorschrift gereinigten Caseïn waren also die 4 Säuren vorhanden, und ich sehe in diesem Versuche einen neuen Beweis für die Ansicht, dass der Gehalt des Caseïnniederschlages an Säuren nicht von einer chemischen Verbindung, sondern vielmehr nur von einer Verunreinigung herrühre.

Da ich oben gezeigt habe, dass es, wenn auch schwierig, doch gut möglich ist, das mit Säuren gefällte Caseïn durch anhaltendes Auswaschen mit Wasser vollständig von der Säure zu reinigen, und da ich aus dieser Beobachtung weitere Schlüsse bezüglich der Natur des so gereinigten Caseïnniederschlages gezogen habe, so ist es selbsverständlich, dass diese Schlüsse nur unter der Voraussetzung zutreffen, dass der so behandelte Käsestoff auch gemeines, typisches Caseïn gewesen sei. Dass dem auch so ist, habe ich schon oben gesagt, aber es bleibt mir noch übrig diese Behauptung durch Thatsachen zu begründen.

Durch mehr als 2—3-tägiges Auswaschen kann das Caseïn etwas schwerlöslicher werden, und die nun folgenden Angaben beziehen sich

desshalb nur auf das nicht mehr als 2 Tage ausgewaschene, ganz schwefelsäurefreie Caseïn.

Die Reaction des durch anhaltendes Auswaschen von Schwefelsäure vollständig befreiten Caseïns ist eine stark saure. Zwar theilt auch dieses Caseïn dem Wasser keine saure Reaction mit; aber wenn man das Caseïn in Substanz auf ein angefeuchtetes Lackmuspapier bringt, wird letzteres fast augenblicklich stark roth gefärbt. Es verhält sich also auch das von anhängender Säure vollständig gereinigte Caseïn dem Lackmuspapiere gegenüber wie eine starke Säure. Dass dem Wasser trotzdem keine saure Reaction mitgetheilt wird, hängt von der Unlöslichkeit oder der wenigstens ungemein grossen Schwerlöslichkeit des so gereinigten Caseïns ab. Man findet nämlich bei dem Auswaschen des Caseïns, dass so lange noch das Waschwasser etwas Schwefelsäure enthält auch nicht gerade schwer nachweisbare Spuren von Caseïn in das Filtrat übergehen; wenn man dagegen das Auswaschen so lange fortgesetzt hat, bis das Waschwasser keine Schwefelsäure mehr enthält, sind auch die darin vorhandenen Spuren von Caseïn so unbedeutend, dass sogar mit Gerbsäure kaum mehr als eine schwach bläulich weisse, erst nach einiger Zeit in einen ausserordentlich spärlichen Niederschlag übergehende Opalescenz sichtbar wird. Das genau ausgewaschene Caseïn ist also fast absolut unlöslich in Wasser, während das noch von Säure verunreinigte darin etwas löslicher ist.

In naher Beziehung zu der Wirkung auf Lackmuspapier steht auch die Eigenschaft des Caseïns mit Alkalien und alkalischen Erden Verbindungen einzugehen. Die Verbindungen des Caseïns mit den Alkalien können je nach der Menge des Caseïns und des Alkalis neutral, alkalisch oder sauer reagiren, und es ist sehr leicht, eine ziemlich stark sauer reagirende Caseïnlösung zu erhalten. Zu dem Ende ist nichts Weiteres nöthig, als das mit Wasser fein zerriebene Caseïn durch Zusatz von einer möglichst kleinen Menge einer mit Lackmus gefärbten Alkalilauge zu lösen. Man wird dabei bemerken, wie die blaue Farbe allmählich erst in eine violette und dann in eine röthliche übergeht. Umgekehrt kann man auch zu einer mit Lackmus gefärbten, alkalisch reagirenden Caseinlösung allmählich verdünnte Essigsäure setzen, und man wird dabei sehen, wie der nach jedem Zusatz von Säure entstehende Niederschlag sich mehr weniger rasch wieder auflöst, bis eine etwas opalisirende, sauer reagirende, weisslich roth gefärbte Caseïnlösung erhalten wird. In der zuletzt angegebenen Weise ist es aus Gründen, die später

verständlich werden sollen, noch leichter eine stark sauer reagirende Caseïnlösung darzustellen.

Wie mit den kaustischen Alkalien kann das säurefreie Caseïn auch mit kohlensauren und phosphorsauren Alkalien sauer reagirende Lösungen geben. In derselben Weise verhält es sich auch zu den alkalischen Erden und deren Carbonaten. Wenn man das Caseïn mit kohlensaurem Kalk und Wasser zusammenreibt und diese Mischung unter oft wiederholtem Umschütteln einige Zeit stehen lässt, so löst sich das Caseïn allmählich zu einer opalisirenden, kalkhaltigen Flüssigkeit auf. Es wird dabei aus dem Carbonate Kohlensäure frei gemacht, wenn auch dies, wegen der nur allmählich stattfindenden Zersetzung nicht ohne Weiteres sichtbar ist. Die Fähigkeit des ganz schwefelsäurefreien Caseïns den kohlensauren Kalk unter Austreibung von Kohlensäure zu zerlegen, konnte ich indessen auf folgende Weise zeigen.

Ich vertheilte das staubfeine, getrocknete Caseïn möglichst fein in ausgekochtem Wasser durch Schütteln in einem kleinen Glaskolben, pumpte mit der Luftpumpe aus und liess die entweichenden Gase durch klares Barytwasser streichen. Nachdem ich mich durch dieses Verfahren von der völligen Abwesenheit von Kohlensäure — mit Ausnahme von den nicht in Betracht kommenden Spuren dieses Gases, welche von der in dem Kölbchen mit eingeschlossenen kleinen Luftmenge herrühren — überzeugt hatte, brachte ich in das Kölbchen eine kleine Menge von eben erhitztem, noch warmem kohlensaurem Kalk hinein und pumpte wiederum möglichst bald aus. Bei der unmittelbar nach der Einführung des Calciumcarbonates vorgenommenen Auspumpung wurden wiederum nur unbedeutende, von der bei dem Einführen des Carbonats mit eingebrachten Luft herrührende Spuren von Kohlensäure erhalten; wenn ich dagegen etwas später, nachdem ich dem Caseïn die zur vollständigen Lösung desselben nöthige Zeit gegeben hatte, das Auspumpen von Neuem versuchte, entwichen so bedeutende Kohlensäuremengen, dass in der vorher durch Spuren von Baryumcarbonat nur wenig getrübten Flüssigkeit ein sehr reichlicher Niederschlag von Carbonat entstand.

Das Caseïn hat also unzweifelhaft die Fähigkeit, den kohlensauren Kalk zu zersetzen; aber es ist sehr wahrscheinlich, dass das Caseïn dabei nur einen Theil des Carbonates zerlegt, während der Rest durch das Caseïn in Lösung gehalten wird. Man findet nämlich, dass auch umgekehrt eine Lösung von Caseïn in Kalkwasser mit viel Kohlensäure behandelt werden kann ohne gefällt zu werden. Wie von dem Calcium-

phosphate kann also das Caseïn auch von dem Calciumcarbonate bedeutende Mengen in Lösung halten.

Das Verhalten des Caseïns zu Lackmuspapier und die Fähigkeit dieses Eiweissstoffes, nicht nur mit dem Alkali saure Verbindungen einzugehen sondern auch das Calciumcarbonat unter Freimachen von Kohlensäure zu zerlegen, zeigen also, dass selbst der reine, von jeder nachweisbaren Spur der zur Fällung benutzten Säure gereinigte, Käsestoff eine Säure ist.

In Bezug auf die Leichtigkeit, mit welcher die Auflösung des Caseïns in Alkalien, Erden und Carbonaten von Statten geht, habe ich keinen Unterschied zwischen dem gewöhnlichen und dem anhaltend ausgewaschenen Käsestoff finden können, vorausgesetzt, dass das Auswaschen nicht mehr als 2—3 Tage fortgetetzt wurde. Bei einem noch länger fortgesetzten Auswaschen wurde dagegen das Caseïn, wie schon oben bemerkt worden ist, wenigstens in einigen Fällen unzweifelhaft etwas schwerlöslicher.

Wie das gewöhnliche hat auch das ganz säurefreie Caseïn die Fähigkeit reichliche Mengen von Calciumphosphat zu lösen, und wie jenes hat es auch die Eigenschaft mit Lab sehr schön zu gerinnen. Ich habe also gar keinen Unterschied zwischen dem durch Fällung mit Essigsäure — nach dem oben angegebenen Verfahren — dargestellten und dem mit Schwefelsäure niedergeschlagenen, durch tagelanges Auswaschen von Schwefelsäure vollständig befreiten Caseïn auffinden können.

Da wir oben gesehen haben, dass ein Theil der zur Fällung des Caseïns angewandten Säure dem Niederschlage so hartnäckig anhaftet, dass — wenn es sich um die Darstellung von grossen Caseïnmengen handelt — er kaum durch ein 5—6-tägiges Auswaschen zu entfernen ist, und da ich weiter gesehen habe, dass der Käsestoff durch solch ein anhaltendes Auswaschen, wenn er auch nicht in Fäulniss übergeht, doch leicht verändert (resp. schwerlöslicher) werden kann, so entsteht natürlich leicht die Frage, ob es überhaupt möglich sei, ein ganz reines, namentlich säurefreies Caseïn in grösserer Menge darzustellen.

Es dürfte dies bei Anwendung von Mineralsäuren, z. B. Schwefelsäure, wenn überhaupt möglich unzweifelhaft sehr schwierig sein, während durch Fällung mit Essigsäure das Caseïn weit leichter in reinem Zustande zu erhalten ist. Wie schon oben bemerkt worden ist, hat schon Lehmann[1]) behauptet, dass der mit Essigsäure erzeugte Caseïn-

[1]) C. G. Lehmann: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 2. Auflage Leipzig 1853.

niederschlag keine Essigsäure enthält; und es haben weiter MILLON & COMMAILLE[1]) behauptet, dass die Verbindung des Caseïns mit Essigsäure durch Waschen mit Wasser leicht zersetzt werde. Auf diese letztere Behauptung kann ich, da wir überhaupt keinen Grund zur Annahme von einer chemischen Verbindung zwischen dem Caseïn und der zur Fällung benutzten Säure haben, kein sehr grosses Gewicht legen, während der Angabe von LEHMANN ein um so grösseres Gewicht zuerkannt werden muss, als ihre Richtigkeit schon an sich sehr wahrscheinlich ist. Wenn nämlich das mit Essigsäure gefällte Caseïn nicht mit der Säure sich chemisch verbindet sondern nur von ihr verunreinigt ist, so lässt sich mit ziemlich grosser Wahrscheinlichkeit voraussagen, dass die verunreinigende Säure bei dem Trocknen des staubfeinen Caseïns vollständig entweichen werde, während dies, wenn man eine chemische Verbindung zwischen dem Caseïn und der Essigsäure annimmt, kaum oder wenigstens nicht mit demselben Grade von Wahrscheinlichkeit zu erwarten ist. Wenn das getrocknete Caseïn keinen Gehalt an Essigsäure besitzt, würde dies also wenigstens nicht für eine chemische Verbindung zwischen dem Caseïn und der Säure sprechen, und dies war also auch ein Grund, warum ich das nach meiner oben beschriebenen Methode, durch 3-maliges Fällen mit Essigsäure, dargestellte Caseïn auf einen Gehalt an Essigsäure prüfen musste.

Bei dieser Prüfung konnte ich nicht die mit überschüssiger Schwefelsäure versetzten Caseïnlösungen direct der Destillation unterwerfen. Einerseits schäumen nämlich solche Lösungen beim Erhitzen oft recht stark und andererseits war es zu befürchten, dass durch die bei der Destillation nothwendige, allmählich stattfindende starke Concentration der Schwefelsäure eine Zersetzung des Caseïns unter Bildung von flüchtigen Säuren, vielleicht auch von Essigsäure, stattfinden würde. Ich verfuhr desshalb so, dass ich den bei 100° C. getrockneten Käsestoff erst in Wasser mit Hülfe von so viel Alkali löste, dass eine ziemlich stark alkalisch reagirende Lösung erhalten wurde, und aus dieser Lösung durch Eintragen von überschüssigem, gepulvertem Magnesiumsulfat das Caseïn entfernte. Nach dem Auswaschen des Niederschlages mit einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung wurden die gesammelten Filtrate mit Schwefelsäure angesäuert und der Destillation unterworfen.

Trotzdem, dass ich solche Versuche mit 15, 20 und 25 Gm. Caseïn ausgeführt habe, ist es mir noch nie gelungen, Spuren von Essigsäure

---

[1]) A. a. O.

in den Destillaten nachzuweisen. Es ist nun allerdings wahr, dass sehr kleine Essigsäuremengen nicht mit derselben Leichtigkeit wie die entsprechenden Schwefelsäuremengen zu entdecken sind, und ich will also nicht die Möglichkeit in Abrede stellen, dass bei dem eben beschriebenen Verfahren Spuren von Essigsäure übersehen werden können. Aber selbst in diesem Falle können doch wahrscheinlich höchstens nur ganz zu vernachlässigende Spuren von Essigsäure das Präparat verunreinigen, denn es würde doch schwerlich eine namhafte Verunreinigung des Caseïns mit dieser Säure — bei Anwendung von so grossen Caseïnmengen wie 15—25 Gm. — der Aufmerksamkeit gänzlich entgehen können.

Durch 3-maliges Ausfällen des Caseïns mit Essigsäure (damit die sauren Phosphate und die übrigen Milchsalze vollständig entfernt werden), durch feines Zerreiben des Niederschlages und Auswaschen bis zum Erhalten von einem gar nicht sauer reagirenden Waschwasser, durch darauf folgendes Behandeln mit Alkohol-Aether und endlich durch Trocknen des staubfeinen Caseïns erst mit der Luftpumpe und dann bei 100^0 C, ist es also möglich ein Präparat zu erhalten. welches sämmtliche Eigenschaften des Milchcaseïns besitzt und als gänzlich frei von Essigsäure sich erweist.

Das Verhalten zu Salzen betrachten bekanntlich die meisten Forscher als einen sehr wichtigen Unterschied zwischen Globulinen und Albuminaten, und es ist auch wegen dieses Umstandes von Interesse, das Verhalten des Caseïns zu Salzen etwas näher zu prüfen. Es ist dies um so mehr nöthig, als bezüglich dieses Verhaltens die Angaben der Verfasser etwas auseinander gehen. Ich will in dieser Hinsicht nur daran erinnern, dass nach Lehmann [1]) das mit Essigsäure gefällte Caseïn in Lösungen von Salmiak, Salpeter und anderen Neutralsalzen sehr leicht löslich sein soll, während nach Hoppe-Seyler [2]) und mehreren anderen Forschern das Caseïn gerade wegen der Unlöslichkeit in NaCl zu den Globulinen nicht gerechnet werden kann. Da ich in Bezug auf die Löslichkeit des Kuhcaseïns in Salzen auch einige Erfahrungen gesammelt habe, sei es mir gestattet, über einige in dieser Richtung ausgeführten Versuche hier zu berichten.

Wenn man die Milch mit verschiedenen Säuren zu fällen versucht macht man bald die Erfahrung, dass das Caseïn nicht durch äquivalente

---

[1]) A. a. O.

[2]) Hoppe-Seyler: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 4. Auflage.

Mengen der verschiedenen Säuren zu fällen ist, und vor Allem macht sich ein grosser Unterschied geltend zwischen der Essigsäure einerseits und den Mineralsäuren, wie Salzsäure und Schwefelsäure, andererseits. Um aus einer und derselben Milch das Caseïn mit Säuren niederzuschlagen, hat man also von der Essigsäure eine nicht unbedeutend grössere Menge wie von der Salzsäure nöthig, was ich hier mit einigen Beispielen zeigen will. Ich bereitete mir einerseits eine Zehntelnormalsalzsäure und andererseits auch eine Zehntelnormalessigsäure, welch letztere ich doch, um die Resultate recht schlagend zu machen, absichtlich ein wenig zu stark bereitete. Mit diesen beiden, fast äquivalenten Säuren versuchte ich die mit 4 Vol. destillirten Wassers verdünnte Milch zu fällen und ich fand dabei in einem Versuche, dass 20 Cc. Milch mit 80 Cc. Wasser verdünnt von der Essigsäure 13 Cc. zum Erhalten von einer bleibenden Fällung erforderten, während von der Zehntelnormalsalzsäure, um denselben Punkt zu erreichen, nur 9 Cc. nöthig waren. In einem zweiten Versuche mit einer anderen Milch, aber bei Anwendung von derselben absoluten Milchmenge und derselben Verdünnung mit Wasser, waren von der Zehntelnormalessigsäure 12,5 Cc. und von der Zehntelnormalsalzsäure 8,7 Cc. für das Entstehen von dem ersten bleibenden Niederschlage nöthig. Ich habe solche Versuche wiederholt ausgeführt, und ich bin dabei stets zu dem Resultate gekommen, dass von der Essigsäure eine grössere Menge wie von einer äquivalenten Salzsäure oder Schwefelsäure zur Fällung des Caseïns erforderlich ist.

Es hat dieses Resultat unzweifelhaft etwas Befremdendes, denn es ist nicht leicht ohne Weiteres zu verstehen, warum äquivalente Mengen von verschiedenen Säuren, die doch alle das Caseïn aus seiner Verbindung mit dem caseïnlösenden Alkali, resp. dem Kalke frei machen, eine ungleich starke Wirkung ausüben sollen. Zur Erklärung von diesem eigenthümlichen Verhalten bieten sich zwar mehrere Auswege dar, aber in erster Hand könnte man an eine ungleiche Wirkung derjenigen Salze denken, die bei der Anwendung von verschiedenen Säuren nothwendig entstehen müssen. Es ist nämlich ganz unzweifelhaft, dass das Caseïn nicht ganz unlöslich in Salzen ist, und vor Allem scheinen die Salze, wenn sie schon von vorneherein in der Milch, resp. in der Caseïnlösung vorhanden sind, eine der Ausfällung des Caseïns hinderliche Wirkung auszuüben. Ich gedenke hier nicht nur der allbekannten älteren Angabe, dass eine mit einer genügenden Menge Kochsalz oder Salpeter versetzte Milch zwar einer Säuerung anheimfallen aber doch nicht gefällt werden

soll, sondern ich will an eine, von Alex. Schmidt[1]) herrührende Angabe erinnern, der zufolge die durch Dialyse von den Salzen befreite Milch durch Säuren leichter gefällt werden soll. Es kann diese grössere Fällbarkeit zwar von dem Entfernen der Alkaliphosphate durch Dialyse herrühren, denn diese Salze sollen ja den gang und gäben Erfahrungen gemäss einen wesentlichen Einfluss auf die Fällbarkeit das Caseïns ausüben; aber sie könnte auch vielleicht von dem Entfernen der anderen Milchsalze durch Dialyse herrühren.

Um die Frage zu entscheiden, ob eine ungleiche Fähigkeit der verschiedenen Säuren das Caseïn zu fällen von einer fällungswidrigen Wirkung der gleichzeitig anwesenden oder erst bei Zusatz von Säuren entstehenden Salze herrühren könnte, verfuhr ich in folgender Weise.

Ein mit Chlorwasserstoffsäure 3 Mal ausgefälltes Caseïn wurde durch Zusatz von reiner Natronlauge in Wasser gelöst und diese Lösung der Dialyse unterworfen. Nachdem die Dialyse mehrere Tage, bis zum gänzlichen Verschwinden von jeglicher Chlorreaction in den Diffusaten fortgesetzt worden war, wurden von dieser Lösung 4 Proben auf je 10 Cc. abgemessen. Die eine Probe wurde, behufs einer qvantitativen Bestimmung des Caseïns, in einer Platinschale eingetrocknet und die Menge des Caseïns — die nicht genau wägbare Menge Asche mitgerechnet — zu 2,04 % bestimmt. Von den 3 noch übrigen Proben wurde die eine, *a*, einfach mit 20 Cc. Wasser verdünnt, zu der zweiten, *b*, setzte ich erst 10 Cc. einer Zehntelnormalnatronlauge und dann 10 Cc. einer Zehntelnormalessigsäure; die dritte Probe, *c*, endlich wurde erst mit 10 Cc. einer Zehntelnormalnatronlauge und dann mit 10 Cc. einer Zehntelnormalchlorwasserstoffsäure versetzt. Darauf wurde jeder Probe die zur Fällung erforderliche Menge der Zehntelnormalessigsäure zugesetzt und dabei folgende Zahlen erhalten. Die Probe *a*, welche kein Salz enthielt, erforderte zur Fällung 1,1 Cc. Zehntelnormalessigsäure; zu der Natriumacetat enthaltenden Probe *b* musste ich dagegen nicht weniger als 4,2 Cc. Zehntelnormalessigsäure setzen, und in der NaCl-haltigen Probe *c* trat die Fällung nach Zusatz von 1,6 Cc. Zehntelnormalessigsäure auf.

Ein anderer Versuch, wo ich mit einer Lösung von 2,62 % Caseïn arbeitete, gab folgendes Resultat. In der Probe *a* waren 10 Cc. Caseïnlösung erst mit 20 Cc. Zehntelnormalnatronlauge und dann mit 20 Cc.

---

[1]) Alexander Schmidt: Weitere Untersuchungen des Blutserum, des Eiereiweisses und der Milch durch Dialyse mittelst geleimten Papieres. Pflügers Archiv. Band 11.

Zehntelnormalessigsäure verdünnt worden, und zur Fällung des Caseïns waren in dieser Probe 7,8 Cc. Zehntelnormalessigsäure nöthig. In der Probe *b* dagegen, welche neben 10 Cc. Caseïnlösung 20 Cc. Zehntelnormalnatronlauge und 20 Cc. Zehntelnormalchlorwasserstoffsäure enthielt, wurde das Caseïn schon durch 2,3 Cc. Zehntelnormalessigsäure gefällt.

Ich bemerke ausdrücklich, dass die zu diesen Versuchen benutzte Essigsäure der ebenfalls benutzten Zehntelnormalnatronlauge nicht ganz äquivalent sondern absichtlich ein wenig zu stark war. Gleiche Volumina der beiden Lösungen gaben nämlich nicht eine alkalisch reagirende sondern eine die Lackmustinctur rothviolet färbende Flüssigkeit, und es kann also die ungleiche Wirkung des Kochsalzes und des Natriumacetates nicht durch eine alkalische Reaction des letzteren erklärt werden, was übrigens schon durch die Grösse des Unterschiedes unmöglich sein würde.

In Bezug auf die eben angeführten Versuche muss ich ausserdem bemerken, dass ihre Ausführung mit nicht unbedeutenden Schwierigkeiten verknüpft ist. Bei jedem Zusatz von Säure entsteht nämlich ein Niederschlag, welcher anfänglich rasch, später aber nur allmählich und schwierig sich auflöst, während die Flüssigkeit nach jeder Wiederauflösung eines Niederschlages stärker opalisirend wird. Setzt man auf ein Mal zu viel Säure zu, so erhält man einen aus ziemlich grossen Klümpchen oder Flöckchen bestehenden Niederschlag, der nur langsam und schwierig sich wieder auflöst. Man muss desshalb die Säure mit derselben — und zwar möglichst grössten — Vorsicht zu allen Proben setzen und darauf ruhig warten, bis jeder Niederschlag unter fleissigem Umrühren sich wieder aufgelöst hat. Die Opalescens nimmt dabei — wie oben gesagt wurde — stetig zu, und bei vorsichtiger Arbeit kann man auf diese Weise fast milchweisse, stark sauer reagirende Caseïnlösungen erhalten, die in dünneren Schichten ganz durchsichtig sind. Da, wenn die Proben neben einander gestellt werden, eine ungleich starke Opalescens leicht zu bemerken ist, könnte man vielleicht auch die zum Hervorrufen von derselben Opalescens in allen Proben erforderlichen Säuremengen bestimmen. Ich habe es doch besser gefunden, diejenigen Säuremengen zu bestimmen, die zum Erhalten von dem ersten, nicht mehr verschwindenden Niederschlage erforderlich sind.

Nach den oben als Beispiele angeführten Versuchen, zu denen ich, wenn es nöthig wäre, noch andere fügen könnte, unterliegt es also keinem Zweifel, dass die von vornherein in einer Lösung anwesenden oder

erst bei Zusatz von Säuren entstehenden Salze einen unverkennbaren Einfluss auf die zur Fällung des Caseïns nöthige Säuremenge ausüben können. Die quantitativ sehr ungleiche Wirkung, welche in dieser Beziehung zwischen Natriumacetat und NaCl obwaltet, erklärt auch leicht, warum äquivalente Mengen von Essigsäure und Chlorwasserstoffsäure bei der Fällung des Caseïns aus der Milch eine ungleich starke Wirkung ausüben. Die Fähigkeit des Acetates, die Ausfällung des Caseïns zu verhindern, wächst, wie ich gefunden habe, wenigstens innerhalb gewisser Grenzen mit der Menge des zugesetzten Salzes, und mit der Menge des anwesenden Acetates muss dem entsprechend auch die Menge der zugesetzten Essigsäure vermehrt werden. Es ist nunmehr also leicht zu verstehen, wie ich oben (pag. 8) behaupten konnte, dass mit der Menge des zur Auflösung des Caseïns benutzten Alkalis auch die Menge der zur Fällung nöthigen Säure wachsen müsse.

Die fällungshemmende Wirkung des Kochsalzes trat in den oben angeführten Versuchen nicht recht scharf hervor; und ich will desshalb, um die fällungswidrige Wirkung auch dieses Salzes zu zeigen, hier einen Versuch anführen, zu dem — wie zu den übrigen hierher gehörenden — ein mit Chlorwasserstoffsäure 3 Mal gefälltes, in wenig Natronlauge gelöstes und durch Dialyse von Chloralkalien vollständig befreites Caseïn verwendet wurde.

Von der chlorfreien Caseïnlösung, welche 3,24 % Caseïn enthielt, wurden 2 Proben auf je 10 Cc. abgemessen und die eine mit 10 Cc. Wasser, die andere mit 10 Cc. einer 12-procentigen NaCl-lösung verdünnt. Erstere Probe erforderte zur Fällung nur 1,3 Cc. Zehntelnormalessigsäure, während die letztere erst von 4 Cc. gefällt wurde. Diejenige Probe, welche 6 % NaCl enthielt, erforderte also zur Fällung fast genau 3 Mal so viel Essigsäure wie die NaCl-freie Probe. Auch die Fällbarkeit der Milch mit Säuren wird durch Zusatz von Chloralkalien herabgesetzt, wie der folgende Versuch zeigen wird.

Von einer ganz frischen, amphoter aber überwiegend alkalisch reagirenden Kuhmilch, deren Gehalt an Caseïn, nach Hoppe-Seylers Methode bestimmt, 2,08 % Caseïn betrug, wurden 2 Proben auf je 20 Cc. abgemessen und die eine mit 80 Cc. Wasser, die andere mit 80 Cc. einer KaCl-lösung von 2,5 % verdünnt. Die erste dieser Proben erforderte zur Fällung 13,1 Cc. Zehntelnormalessigsäure, während die andere Probe, deren Gehalt an KaCl 2 % betrug, erst von 26 Cc. Zehntelnormalessigsäure gefällt wurde. Es ist wohl kaum nöthig zu bemerken, dass in

diesem Falle wie in allen anderen, wo die Fällung des Caseïns durch Salze mehr weniger verhindert wurde, die Reaction der Flüssigkeit eine entschieden saure wurde.

Die nun angeführten Versuche, denen ich, wenn es nöthig wäre, noch andere zufügen könnte, zeigen also, dass die Salze eine der Fällung des Caseïns durch Säuren hinderliche Wirkung ausüben können, wenn auch nicht alle Salze diese Fähigkeit in gleich hohem Grade besitzen.

Ich glaube, dass diese Beobachtungen nicht ganz ohne Interesse sind. Es ist nämlich eine längst bekannte Thatsache, dass die Milch bis zu einem gewissen Grade angesäuert werden kann, ohne gefällt zu werden, und gewöhnlich erklärt man dieses Verhalten durch die Anwesenheit des phosphorsauren Alkalis, welches dabei zuerst in ein saures Salz übergeführt werden soll. Es lehren nun die oben mitgetheilten Versuche, dass nicht nur die Milch sondern auch reine Caseïnlösungen, die keine Spur von Phosphaten enthalten, ziemlich stark angesäuert werden können, ohne einen Niederschlag zu geben, und eine fällungshemmende Wirkung kommt also nicht nur den Phosphaten, sondern auch anderen Salzen zu. Diese Wirkung giebt sich auch bei Anwesenheit von sehr kleinen Salzmengen noch deutlich kund; und der Grund, warum selbst sehr alkaliarme Caseïnlösungen, ohne gefällt zu werden, schwach angesäuert werden können, liegt wahrscheinlich darin, dass das auch in diesem Falle mit Nothwendigkeit gebildete Salz, entsprechend seiner Menge, der Fällung mehr weniger entgegenwirkt.

Die Fähigkeit des Natriumacetates und der Chloralkalien die Ausfällung des Caseïns zu verhindern zeigt wohl schon, dass dieser Eiweissstoff nicht ganz unlöslich in Salzen ist; und es fragt sich also, ob es nicht auch möglich sei, das schon mit Säure ausgefällte Caseïn durch Salze wieder aufzulösen? Dies ist, wie ich durch besondere zu dem Zwecke ausgeführten Versuche gefunden habe, in der That wirklich möglich. Wenn man das Caseïn in Wasser unter Zusatz von nur wenig Alkali löst, diese Lösung ziemlich stark mit Wasser verdünnt und dann vorsichtig mit Essigsäure unvollständig fällt, damit kein aus grossen harten Körnern oder Flocken bestehender Niederschlag gebildet werde, so löst sich dieser Niederschlag nach Zusatz von NaCl mehr weniger rasch zu einer opalisirenden Flüssigkeit auf. Wenn dagegen etwas zu viel Essigsäure zugesetzt worden ist, oder wenn die Lösung so concentrirt war, dass der Niederschlag als harte, gröbere Körner oder Flocken sich absetzt, ist er auch unlöslich oder wenigstens nur wenig löslich in NaCl-solution. Uebrigens löst sich das mit Essigsäure ausgefällte Caseïn

am leichtesten unmittelbar nachdem es ausgefällt worden ist, und wenn man es längere Zeit mit Wasser in Berührung lässt, löst es sich nach Zusatz von NaCl nicht mehr auf. Das Caseïn verhält sich also gegenüber dem NaCl wie gewisse Globuline, welche, wie dies neuerdings von Weyl[1]) bei Gelegenheit seiner Untersuchungen über das vermehrte menschliche Fruchtwasser beobachtet wurde, kurze Zeit nach der Ausfällung noch in NaCl löslich sind, aber wenn man sie längere Zeit mit dem Wasser in Berührung lässt, in Salzen unlöslich werden.

Die Löslichkeit des mit Säuren ausgefällten Caseïns in NaCl ist, wie schon oben angegeben wurde, in hohem Grade von der Menge der zugesetzten Säure abhängig, und nur bei vorsichtigem Zusatz von Säuren ist es möglich ein in NaCl lösliches Caseïn zu erhalten. Meine Erfahrungen stimmen also sehr gut mit den Beobachtungen von Denis[2]) überein. Nach diesem Forscher ist nämlich das mit möglichst wenig Salzsäure gefällte Caseïn, »das reine Caseïn», in Salzen leicht löslich, das mit mehr Salzsäure gefällte, »chlorwasserstoffsaure Caseïn», dagegen in Salzen unlöslich. Ich will nun allerdings nicht läugnen, dass die ungleiche Löslichkeit des mit ungleichen Säuremengen gefällten Caseïns durch die Annahme von Denis erklärt werden könne; aber ich glaube, dass sie noch besser durch die ungleiche physikalische Beschaffenheit des in beiden Fällen erhaltenen Niederschlages zu erklären sei. Das mit möglichst wenig Säure gefällte Caseïn scheidet sich nämlich als ein ungemein feinkörniger oder jedenfalls als ein sehr lockerer Niederschlag aus; das mit mehr Säure gefällte Caseïn ballt sich dagegen zu grösseren harten Klümpchen zusammen, die bald schrumpfen und auch nach dem Zerreiben harte, stark geschrumpfte Körnchen bilden.

Wenn der durch Zusatz von nicht zu viel Säure erzeugte Caseïnniederschlag unter Wasser aufbewahrt wird, ballt er sich allmählich zusammen, die Flöckchen oder Klümpchen schrumpfen, werden härter und lösen sich nunmehr auch nicht oder nur schwer in Salzen auf. Der Umstand, dass der Caseïnniederschlag unmittelbar nach der Ausfällung die grösste Löslichkeit besitzt und erst allmählich schwerlöslicher wird, kann also auch vielleicht daher rühren, dass das Wasser allmählich die physikalischen Eigenschaften des Niederschlages verändert.

In wie weit diese, für die Schwerlöslichkeit des mit mehr Säure gefällten oder einige Zeit unter Wasser aufbewahrten Caseïns in NaCl

[1]) Th. Weyl: Ein Beitrag zur Kenntniss des vermehrten menschlichen Fruchtwassers (Hydramnion). Separatabzug aus Reicherts und Du Bois-Reymonds Archiv.

[2]) A. a. O.

oben versuchte, Erklärung eine zutreffende sei, lasse ich übrigens dahingestellt sein; aber immerhin kann man zeigen, dass die veränderte Löslichkeit nicht von einer nachweisbaren chemischen Veränderung des Caseïns herrühren kann. Wenn man nämlich den durch Zusatz von zu viel Säure oder durch Aufbewahren unter Wasser in NaCl unlöslich gewordenen Caseïnniederschlag — vorausgesetzt, dass er in letzterem Falle nicht zu lange unter Wasser aufbewahrt worden ist — wiederum in Wasser mit etwas Natronlauge löst, die Lösung mit Wasser verdünnt und mit ein wenig Essigsäure vorsichtig fällt, so erhält man wiederum das in NaCl leicht lösliche Caseïn, und dieser Versuch kann mehrere Male wiederholt werden. Diese Beobachtungen sind, wie leicht zu ersehen ist, nicht ohne Bedeutung mit Rücksicht auf die Brauchbarkeit des zur Reingewinnung des Caseïns von mir eingeschlagenen Verfahrens.

Die oben angeführten Beobachtungen zeigen also, dass das Caseïn nicht wie man gewöhnlich annimmt ganz unlöslich in Salzen ist, und auch diese Beobachtung dürfte nicht ganz ohne Interesse sein. Die Löslichkeit, resp. Unlöslichkeit in Neutralsalzen betrachtet man nämlich gewöhnlich als den wichtigsten Unterschied zwischen den nativen Albuminaten (den Globulinen) und den künstlichen Albuminaten, und wenn nun auch das Caseïn in Salzen löslich ist, entsteht also die Frage, ob nicht auch dieser Eiweissstoff zu den Globulinen gerechnet werden müsse. Gegen einen solchen Vorschlag könnte zwar eingewendet werden, dass der Käsestoff eine weit geringere Löslichkeit in Salzen als irgend ein bisher bekanntes Globulin besitzt; aber der Unterschied ist doch nur ein quantitativer, wie denn übrigens auch die anderen Globuline eine recht verschiedene Löslichkeit in Salzen besitzen. Wie rücksichtlich der Löslichkeit in Salzen zeigen auch die verschiedenen Globuline wesentliche Unterschiede in Bezug auf die Fällbarkeit durch Salze, und während das Fibrinogen durch überschüssiges NaCl vollständig niedergeschlagen wird, kann das Paraglobulin dadurch nur unvollständig und das Vitellin gar nicht gefällt werden. Ich glaube, dass dieser in Bezug auf die Fällbarkeit zwischen zwei Globulinen, dem Fibrinogen und dem Vitellin, obwaltende Unterschied noch grösser als derjenige ist, welcher in Bezug auf die Löslichkeit in Neutralsalzen zwischen dem Caseïn und einigen Globulinen besteht; und wenn die sehr ungleiche Fällbarkeit des Vitellins und des Fibrinogens kein Hinderniss dafür abgiebt, beide Stoffe zu den Globulinen zu rechnen, finde ich auch keinen Grund, warum nicht das Caseïn, trotz seiner grösseren Schwerlöslichkeit, den Globu-

linen zugerechnet werden könnte. Es ist um so weniger ein Grund dazu vorhanden, das Caseïn von den Globulinen zu trennen, als einerseits das Caseïn unzweifelhaft in mehreren Beziehungen den Globulinen am nächsten verwandt ist, und andererseits die Löslichkeit des Caseïns in Salzen, wie ich dies schon andererorts [1]) gezeigt habe, durch Verunreinigung mit anderen Stoffen wesentlich verändert werden kann.

Zu den gewöhnlichen, künstlich darzustellenden Alkali- oder Kalkalbuminaten kann das Caseïn keineswegs gerechnet werden; und wenn man es nicht zu einer besonderen Gruppe von Stoffen, den Nucleoalbuminen rechnen will — was wohl das Richtigste sein würde — muss wohl das Caseïn mit dem grössten Rechte einen Platz unter den nativen Albuminaten, d. h. den Globulinen, finden.

Ich habe oben gesagt, dess ich das Caseïn durchaus nicht mit irgend einem der künstlich dargestellten Alkalialbuminate identifiiren kann; und die Gründe, welche mich zu einer solchen Ansicht geführt haben, sind vor Allem der nie fehlende Gehalt des Caseïns an Phosphor (Nucleïn) und das eigenthümliche Verhalten dieses Eiweissstoffes zu Lab. Durch dieses Verhalten unterscheidet sich nämlich das Caseïn, wie es schon Anfangs bemerkt wurde, nicht nur von dem Alkali- resp. Kalkalbuminate sondern auch von jedem anderen bisher bekannten Eiweisskörper.

Unter solchen Umständen musste es auch von einem nicht unbedeutenden Interesse sein, nicht nur die näheren Bedingungen für die Caseïngerinnung zu ermitteln sondern auch, wenn möglich, über das Wesen des Gerinnungsvorganges Aufschlüsse zu gewinnen, Zu der Lösung dieser Fragen habe ich in meiner zweiten, im Jahre 1874 erschienenen Abhandlung [2]) einige Beiträge geliefert. Ich fand nämlich in Bezug auf die Gerinnungsbedingungen, dass für die Gerinnung einer Caseïnlösung mit Lab — abgesehen von dem Fermente, dem Caseïn und den Lösungsmitteln für das letztere — eine genügende Menge von Calciumphosphat oder einem anderen Kalksalze anwesend sein muss.

---

[1]) Olof Hammarsten: Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung. Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsala. Ser. III. Vol. X. L,

[2]) Upsala Läkareförenings förhandlingar Bd. 9.

In Bezug auf das Wesen des Gerinnungsvorganges zeigte ich ferner, dass der Käsestoff sich dabei mindestens in zwei neue Eiweissstoffe spaltet, von denen der eine, welcher die ungemein grösste Hauptmasse bildet, schwerlöslicher als das Caseïn ist und den mit dem Calciumphosphate ausfallenden Käse bildet, während das andere in den Molken zurückbleibende Spaltungsprodukt ein peptonähnlicher Stoff ist. Ich zeigte ferner, dass derselbe Vorgang auch ohne Lab durch Erhitzen in zugeschmolzenem Rohre auf 130—150° C. eingeleitet werden kann, und der bei der Gerinnung des Caseïns stattfindende Vorgang schien mir also ein ziemlich einfacher zu sein. Die Gerinnung des Caseïns mit Lab war nämlich nach diesen Beobachtungen ein mit der Gerinnung anderer Eiweissstoffe in der Siedehitze analoger Process, denn auch bei der Gerinnung des Eiweisses in der Siedehitze scheint eine Spaltung stattzufinden; und der eigentliche Unterschied zwischen den beiden Processen lag nur darin, dass bei der Gerinnung des Caseïns die Wärme durch ein Ferment ersetzt werden konnte.

Etwa ein Jahr nach dem Erscheinen meiner Abhandlung veröffentlichte Alexander Schmidt[1]) eine neue Abhandlung, in welcher er die näheren Gerinnungsbedingungen festzustellen versuchte. Die Ergebnisse, zu welchen er bei seinen Untersuchungen gekommen war, wichen indessen in so fern wesentlich von den meinigen ab, als er den Kalksalzen nicht die ihnen von mir zugeschriebene Wirkung zuerkennen wollte, sondern als Vermittler der Gerinnung vielmehr einen ganz unbekannten Stoff betrachtete, dessen Anwesenheit in der Milch er übrigens weder in directer noch in indirecter Weise beweisen konnte. Die ganze Frage wurde also durch diese Untersuchung in hohem Grade verwickelt und so dunkel, dass Schmidt selbst — wie er in der Abhandlung gesteht — den gefundenen Thatsachen gegenüber rathlos sich befand.

Bei einem gründlicheren Durchlesen der Schmidt'schen Abhandlung fand ich es nicht schwierig, den Schlüssel zu der zwischen uns bestehenden Meinungsverschiedenheit zu finden, und es schien mir desshalb auch obliegend zu sein, nicht nur die von mir früher gefundenen Thatsachen durch neue Versuche noch weiter zu erhärten, sondern auch die von Schmidt verwickelte Frage noch ein Mal ins Klare zu bringen. Zu dem Ende habe ich noch einige Versuchsreihen ausgeführt, und obwohl ich inzwischen die Freude gehabt habe, sämmtliche meine Angaben

---

[1]) Alexander Schmidt: Weitere Untersuchungen des Blutserum, des Eiereiweisses und der Milch etc. Pflügers Archiv. Band 11.

durch eine von Kirchner[1]) in Kühnes Laboratorium ausgeführte Nachprüfung bestätigt zu sehen, muss ich doch auf die Schmidt'schen Behauptungen und Versuche hier etwas ausführlicher eingehen.

Schmidt hatte gefunden, dass die Milch durch Dialyse derart verändert wird, dass die Gerinnungsfähigkeit zuerst — nachdem die leicht diffundirenden, nach Schmidts Ansicht ein relatives Gerinnungshinderniss abgebenden Alkalisalze beseitigt worden sind — eine vorübergehende Steigerung erfährt und dann bei fortgesetzter Dialyse allmählich abnimmt, bis sie endlich bei genügend lange fortgesetzter Dialyse gänzlich schwindet. Schmidt erklärte das gänzliche Schwinden der Gerinnungsfähigkeit durch die Annahme, dass die Milch durch Dialyse allmählich irgend eines langsam diffundirenden Stoffes beraubt werde, dessen Anwesenheit ein nothwendiges Bedingniss für die fermentative Caseïngerinnung sein würde.

Es ist Schmidt nicht gelungen dieses, die Labwirkung vermittelnden Stoffes habhaft zu werden, und er konnte nur zeigen, dass in den Diffusaten überhaupt ein die Gerinnung vermittelnder Stoff enthalten sein musste. Durch Zusatz von den unter gewissen Versuchsbedingungen gewonnenen, stark eingeengten, neutralisirten und filtrirten Diffusaten konnte er nämlich der gegen Lab nicht mehr reagirenden Milch die Gerinnungsfähigkeit wiedergeben. Dieses Resultat wurde indessen nicht mit allen Diffusaten gewonnen, sondern nur mit denjenigen, welche während der Dialyse spontan sauer geworden waren, gleichgültig ob die Dialyse mit Pergamentpapier oder mit Leimpapier geschehen war. Es war dabei auch gleichgültig, ob die Diffusate in Vacuo über Schwefelsäure oder im Wasserbade eingeengt wurden, vorausgesetzt nur, dass die Milch während der Dialyse sauer geworden war, und der die Labwirkung vermittelnde Stoff wurde also nicht durch Wärme zerstört. In derselben Weise wie das Diffusat einer während der Dialyse sauer gewordenen Milch wirkten auch die neutralisirten Molken spontan geronnener Milch, während das Diffusat solcher Milch, welche unter Vermeidung des Sauerwerdens durch rasche Dialyse ihre Gerinnungsfähigkeit durch Lab eingebüsst hatte nicht nur unwirksam, sondern sogar hinderlich war. Es wirkten ferner nur diejenigen Diffusate, welche von einer während der Dialyse sauer gewordenen Milch stammten, und eine nachträgliche Säuerung der ursprünglich neutral oder amphoter reagirenden Diffusate

[1]) A. a. O.

erwies sich als gänzlich unwirksam; solche Diffusate wirkten nämlich nur verzögernd oder hemmend auf die Gerinnung. Für diese Beobachtungen fand Schmidt keine befriedigende Erklärung.

Die Möglichkeit, durch Dialyse eine gerinnungsunfähige, nach Zusatz von den concentrirten Diffusaten wieder mit Lab gerinnende Caseïnlösung darzustellen, hatte ich schon vor Alexander Schmidt in meiner zweiten Abhandlung bewiesen. Ich hatte zwar nicht mit der Milch, sondern, um die Versuchsbedingungen wesentlich zu vereinfachen, mit dem durch Zusatz von NaCl wiederholt ausgesalzenen Caseïn meine Versuche ausgeführt, und ich hatte dabei gefunden, dass eine durch Dialyse gerinnungsunfähig gemachte Caseïnlösung nicht nur nach Zusatz von den im Wasserbade eingeengten Diffusaten sondern auch durch Zusatz von Kalkwasser und vorsichtige Neutralisation mit verdünnter Phosphorsäure wieder gerinnungsfähig gemacht werden konnte. Ich betrachtete auch diese Beobachtung als einen Beweis für die Nothwendigheit der Kalksalze bei der Gerinnung.

Die von Schmidt und mir erhaltenen Versuchsresultate stimmen also darin mit einander überein, dass es uns beiden gelungen ist, durch Dialyse eine für die Gerinnung nothwendige Substanz aus der Milch, resp. der Caseïnlösung zu entfernen; aber während nach meiner Ansicht diese Substanz ein Kalksalz ist, konnte Schmidt dagegen den Kalksalzen keine gerinnungsvermittelnde Wirkung zuschreiben.

Es ist, wie ich schon oben angedeutet habe und später ausführlicher zeigen werde, nicht schwierig zu verstehen, wie Schmidt zu dieser irrigen Ansicht geführt werden konnte, aber bevor ich die Schmidt'sche Ansicht etwas eingehender bespreche, muss ich erst meine früheren Angaben durch noch einige Versuche erhärten.

Schmidt hatte gefunden, dass die Milch durch Dialyse gerinnungsunfähig gemacht werden kann, weil dabei der gerinnungsvermittelnde Stoff in die Diffusate übergeht, und obwohl ich schon vorher ganz analoge Versuche mit Lösungen von ausgesalzenem Caseïn ausgeführt hatte, schien es mir also obliegend zu sein, auch einige Dialyseversuche mit der Milch selbst anzustellen.

Zu solchen Versuchen ist nach Schmidt nur geleimtes Papier zu brauchen, denn nur bei Anwendung von solchem Papiere soll es möglich sein, den Milchzucker — wenn man mit der Dialyse energisch vorgeht und das äussere Wasser alle halbe Stunden erneuert — so vollständig zu entfernen, dass das milchsäurebildende Ferment nicht zur Geltung kommt und die Milch schon im Dialysator einer Säuerung un-

terliegt. Trotz dieser Behauptungen habe ich doch zu meinen Versuchen mit sehr gutem Erfolge ein deutsches, von Merck in Darmstadt bezogenes Pergamentpapier gebraucht. Dieses Pergamentpapier, von dem 1 Quadratdecimeter etwa 0,7 Gm. wiegt, hat vor dem De la Rue'schen Wechselformularpapiere und dem geleimten Papiere den bestimmten Vorzug, dass — wenn fehlerfreie Stücke ausgewählt werden — nicht einmal Spuren von Caseïn[1]) durch dasselbe diffundiren; und dennoch geht die Dialyse bei Anwendung von diesem Papiere so rasch von Statten, dass ich, wenn das äussere Wasser während des Tages alle Stunden erneuert wurde, ohne die geringste Schwierigkeit das Sauerwerden der Milch im Dialysator verhindern konnte.

Mittelst dieses Papieres ist es mir leicht gelungen, die Milch in weniger als 24 Stunden ganz gerinnungsunfähig zu machen, und die Milch war also durch dieses Verfahren des gerinnungsvermittelnden Stoffes beraubt worden. Ich habe es nun nicht für nöthig erachtet, dieser Milch durch Zusatz von den passend behandelten Diffusaten die Gerinnungsfähigkeit wiederzugeben, denn durch Zusatz von Diffusaten von unbekannter Zusammensetzung können nach meiner Meinung keine sichere Resultate gewonnen werden. Ich verfuhr desshalb entweder so, dass ich in der durch Dialyse gerinnungsunfähig gemachten Milch erst ein wenig Kalk auflöste und dann mit ein wenig sehr verdünnter Phosphorsäure neutralisirte, oder auch so, dass ich aus der dialysirten Milch das Caseïn erst mit einer Säure fällte, den ausgewaschenen Niederschlag in etwas Kalkwasser löste und mit sehr verdünnter Phosphorsäure neutralisirte. Nach beiden Verfahrungsweisen konnte ich Lösungen von Caseïn und Calciumphosphat darstellen, welche zum Sieden erhitzt werden konnten ohne dabei zu coaguliren, während sie nach Zusatz von Labferment schon bei Zimmerwärme sehr rasch geronnen. Löste ich das gefällte Caseïn statt in Kalkwasser in möglichst wenig einer schwachen Natronlauge oder Natriumphosphatlösung auf, so war die Lösung ganz gerinnungsunfähig, während sie durch Zusatz von Natriumphosphat und Chlorcalcium, in letzterem Falle durch Zusatz von Chlorcalcium allein, sehr leicht wieder gerinnungsfähig gemacht werden konnte.

In Bezug auf das zu diesen und den übrigen in dieser Abhandlung besprochenen Versuchen benutzte Labferment mag hier be-

[1]) Damit bei dem Verdunsten der Diffusate keine Caseïnflöckchen durch Anhaften an der Wand der Schale oder in anderer Weise der Aufmerksamkeit entgehen würden, wurden die Diffusate in Glasschalen eingeengt

merkt sein, dass es durch Fällen eines Glycerinextractes mit Alkohol und Auflösen des Niederschlages in Wasser erhalten worden war. Das Glycerinextract enthielt 0,255 % mit 10 Vol. 97-procentigem Alkohol fällbare Substanz, in welcher, wenn zu jeder Bestimmung 20—25 Cc. Glycerinextract genommen wurden, keine bestimmbare Menge Asche enthalten war. Die Fermentlösungen wurden stets so bereitet, dass der mit 10 Vol. 97-procentigem Alkohol erhaltene Niederschlag auf ein Filtrum gesammelt, rasch mit Alkohol ausgewaschen, stark ausgepresst und mit dem Filtrum, von dem er nicht zu trennen war, in Wasser fein zertheilt wurde. Es wurde dabei der Rückstand von 1 Cc. Glycerinextract stets in 100 Cc. Wasser gelöst, und diese Lösung, wenn nöthig, mit bestimmten Mengen Wasser verdünnt. Die Fermentlösungen enthielten also höchstens 0,00255 % feste Stoffe.

Nach den eben angeführten Versuchen kann es nach meiner Meinung keinem Zweifel unterliegen, dass die Kalksalze zu den die Labgerinnung vermittelnden Stoffen zu rechnen sind, und zu demselben Ergebnisse führten auch die folgenden, mit dem nach meiner Methode gereinigten Caseïn ausgeführten Versuche.

Schmidt giebt an, dass eine durch Fällen mit Essigsäure, wiederholtes Decantiren, Wiederauflösen in verdünnter Natronlauge bis zum Sättigen derselben und Schütteln mit Aether gereinigte, neutrale Lösung von Caseïnnatron durch schwach alkalische Lablösung mit der grössten Leichtigkeit coagulirt wird mit der einzigen Besonderheit, dass die Gerinnsel nicht klumpig, sondern feinflockig erscheinen. Wiederholt man dagegen die Procedur des Fällens, Decantirens und Wiederauflösens ein paar Mal, so schwindet die Gerinnbarkeit mit Lab vollkommen. Schmidt deutet dies so, dass durch die Procedur des Fällens etc. zunächst nur die Alkalisalze und der Milchzucker entfernt werden, während erst bei energischerer Reinigung auch der bei der fermentativen Coagulation wirksame, schwerer zu beseitigende Körper entfernt werden soll.

Der die Gerinnung vermittelnde Stoff geht also bei der Ausfällung des Caseïns mit einer Säure so vollständig in die Filtrate über, dass es, wenn man die Procedur des Fällens etc. ein paar Maal wiederholt, leicht gelingt, ihn gänzlich zu entfernen. Unter diesen Umständen muss wohl auch das von mir durch 3 Mal wiederholtes Ausfällen, durch sorgfältiges Zerreiben unter Wasser und Auswaschen und zuletzt durch Behandeln mit Alkohol-Aether gereinigte Caseïn von dem gerinnungsvermittelnden Stoffe ganz frei sein; und es ist mir in der That auch nie gelungen eine Lösung von solchem Caseïn in möglichst wenig Al-

kali mit Lab zu coaguliren. Nach Zusatz von Kalkwasser und Phosphorsäure oder nach Zusatz von erst ein wenig mehr Alkali und dann Natriumphosphat und Chlorcalcium gelingt es doch leicht eine in der Wärme nicht, nach Zusatz von Lab dagegen rasch und schön gerinnende Lösung zu erhalten.

Wenn schon das nach meinem gewöhnlichen Verfahren gereinigte Caseïn den gerinnungsvermittelnden Stoff nicht enthält, muss wohl das erst 3 Mal mit Chlorwasserstoffsäure gefällte, dann in Natronlauge gelöste, durch Dialyse von den Chloriden befreite, endlich (zum vierten Male) mit Schwefelsäure gefällte, durch tagelanges Auswaschen von der Säure befreite, mit Alkohol-Aether gereinigte Caseïn noch weniger von diesem Stoffe verunreinigt sein können. Es ist desshalb von Interesse, dass auch dieses Caseïn, welches in Wasser — mit Hülfe von möglichst wenig Alkali oder Alkaliphosphat gelöst — nur mit Lab nicht gerinnende Lösungen giebt, nach Zusatz von einer genügenden Menge Kalk und Phosphorsäure mit Lab sehr schön gerinnende Lösungen giebt.

Um ganz sicher zu sein, habe ich mich indessen nicht mit den nun angefürten Versuchen begnügen können, sondern ich habe auch Versuche mit dem 6—8 Mal mit Säuren ausgefällten Caseïn angestellt. Auch in diesen Versuchen ist es mir leicht gelungen, die mit Lab nicht gerinnenden Lösungen des Caseïns in Alkali oder Alkaliphosphat durch Zusatz von einer passenden Menge Kalk und Phosphorsäure in Lösungen zu verwandeln, welche nicht in der Wärme allein, nach Zusatz von Lab dagegen sehr rasch geronnen.

Ich lege ein grosses Gewicht auf den Umstand, dass meine Caseïnlösungen nicht in der Wärme allein sondern erst nach Zusatz von Lab gerinnen. Es ist nämlich leicht, durch Zusatz von zu viel Calciumphosphat oder durch Zusatz von etwas zu viel Phosphorsäure im Verhältniss zu dem Kalke eine in der Wärme allein auch ohne Labzusatz gerinnende Caseïnlösung darzustellen; und wenn man mit einem in Folge der chemischen Manipulationen schwerlöslicher gewordenen Caseïn arbeitet, ist es bisweilen recht schwer, eine nicht in der Siedehitze sondern nur nach Zusatz von Lab gerinnende Caseïnlösung zu erhalten. Wie in den früheren Abhandlungen bemerke ich desshalb auch in dieser, dass ich es nie unterlassen habe, das Verhalten der Caseïnlösungen in der Wärme allein ohne Zusatz von Lab zu prüfen.

Nach den nun angeführten Versuchen muss ich die gerinnungsvermittelnde Wirkung der Kalksalze als eine sichergestellte Thatsache betrachten. Man könnte zwar annehmen, dass ausser den Kalksalzen

vielleicht noch ein zweiter, die Gerinnung vermittelnder Stoff in der Milch enthalten sei; aber dieser zweite Stoff würde nach dem oben Mitgetheilten weder durch Dialyse noch durch 6—8-maliges Ausfällen des Caseïns von dem letzteren zu trennen sein, und es fehlt also gegenwärtig jeder Grund zu einer solchen Annahme.

Wenn ich also die gerinnungsvermittelnde Wirkung der Kalksalze als eine festgestellte Thatsache betrachte, bleibt er mir nun übrig, die widersprechenden Angaben von Alex. Schmidt zu besprechen.

Der erste Grund, warum Schmidt nicht die Kalksalze (die Erdphosphate) als die gerinnungsvermittelnden Stoffe betrachten konnte, war die Beobachtung, dass in einer nicht mehr gegen Lab reagirenden Milch die Eiweissstoffe und die Erdphosphate während der Dialyse gleichmässig abgenommen hatten. Schmidt fand nämlich für 100 Theile Eiweissstoffe in der nach $8^1/_2$-stündiger Dialyse rasch gerinnenden Milch 5,69 und in der nach 30-stündiger Dialyse schlecht gerinnenden Milch 5,20 Theile Erdphosphate.

Schmidt scheint also der Ansicht zu sein, dass, wenn die Erdphosphate die gerinnungsvermittelnden Stoffe wären, die Gerinnung mit Lab erst dann ausbleiben würde, wenn die Phosphate und das Caseïn in ungleichem Maasse durch Dialyse entfernt worden wären; und den Umstand, dass trotz der schwindenden Gerinnungsfähigkeit die Relation zwischen Eiweiss und Phosphaten eine fast unveränderte bleibt, betrachtet er als einen Beweis für die Bedeutungslosigkeit der letzteren bei der Gerinnung.

Es ist offenbar, dass weder diese Voraussetzung eine richtige noch dieser Beweis ein bindender sein kann. Es ist nämlich möglich, dass nicht nur die Relation zwischen dem Caseïn und den Erdphosphaten sondern auch der Procentgehalt der Milch, resp. der Caseïnlösung an diesen Stoffen einen mächtigen Einfluss auf die Gerinnung ausüben könnte, und unter solchen Umständen würde selbstverständlich der von Schmidt gezogene Schluss ein ganz irriger sein. Nun ist es in der That leicht zu zeigen, dass der Procentgehalt der Milch an festen Stoffen einen ungemein grossen Einfluss auf die Gerinnung auszuüben im Stande ist, und zu dem Ende ist es nur nöthig, die Milch mit einer genügenden Menge Wasser zu verdünnen. Durch Verdünnung mit destillirtem Wasser wird offenbar kein Stoff aus der Milch entfernt; es wird dadurch ebenso wenig die Relation zwischen Caseïn und Erdphosphaten verändert und dennoch ist es möglich, durch Verdünnung mit Wasser die Gerinnung ebenso vollständig wie je durch Dialyse aufzuheben. Dieser

sehr wichtige Umstand ist offenbar Schmidt gänzlich entgangen, und dadurch, dass er der durch Dialyse eintretenden Verminderung des Caseïns- und Erdphosphatgehaltes der Milch nicht Rechnung getragen hat, ist er auch zu irrigen Schlüssen gelangt. Unter diesen Umständen muss es mir also obliegend sein, zunächst die Wirkung von Verdünnung mit Wasser auf die Gerinnung durch ein paar Versuche zu zeigen.

Die Ausführung dieser Versuche geschah in folgender Weise. Von einer und derselben möglichst frischen Milch wurde eine Reihe von ungleich grossen Proben genau abgemessen und mit ebenfalls genau abgemessenen, entsprechenden Mengen Wasser verdünnt, so dass eine Reihe Proben von derselben absoluten Grösse aber von zunehmendem Wasser-, resp. abnehmendem Milchgehalte erhalten wurde. Sämmtliche diese Proben wurden darauf in ein mit Wasser von einer bestimmten Temperatur theilweise gefülltes, geräumiges Becherglas eingesetzt und auf die erwünschte Temperatur gebracht. Darauf wurde zu allen Proben dieselbe Menge einer gleichfalls auf dieselbe Temperatur erwärmten Fermentlösung gesetzt und die Zeit genau notirt. Dadurch, dass sämmtliche Proben in einem durchsichtigen Becherglase erwärmt wurden, war es möglich, ohne die Probirrörchen herauszunehmen, durch Drehen oder leises Schütteln derselben den Zeitpunkt genau zu bestimmen, da die Flüssigkeit dickflüssiger wurde, was fast unmittelbar vor dem festen Gerinnen geschah. In den rasch gerinnenden Proben ist es sehr leicht diesen Punkt genau zu bestimmen, aber bei den höheren Verdünnungsgraden ist dies dagegen sehr schwierig. In den sehr verdünnten Proben entsteht nämlich selbstverständlich keine feste sondern eine flockige Gerinnung, welch letztere zudem nicht wie mit einem Schlage auftritt, sondern erst feinkörnig und dann flockig wird. Wenn man die Probirrörchen bei dem Schütteln sehr schief hält, kann man doch ziemlich leicht sehen, wann die an den Wänden zurückfliessende Flüssigkeit ein eigenthümlich feinkörniges Aussehen anzunehmen anfängt, und wenn man nun das Röhrchen von Zeit zu Zeit herausnimmt und die Flüssigkeit in dünneren Schichten betrachtet, kann man mit einiger Uebung ziemlich genau den Zeitpunkt bestimmen, da die erste deutliche Gerinnung auftritt. Selbstverständlich kann dieser Zeitpunkt schwerlich genau auf Minuten angegeben werden; aber in den mehr verdünnten Proben, in welchen die Gerinnung erst nach Stunden stattfindet, ist dies auch gar nicht nöthig.

Zu jedem Versuche wurde nur ganz frische, amphoter aber überwiegend alkalisch reagirende Kuhmilch verwendet. Der Gehalt an Ca-

seïn wurde nach der Methode von HOPPE-SEYLER (Fällen mit Essigsäure und Kohlensäure); der Gehalt an unlöslichen Salzen dagegen nach der Methode von ALEX. SCHMIDT (Fällen mit Alkohol) bestimmt. Die Fermentlösungen waren nach dem oben angegebenen Verfahren bereitet und wenn ich in dieser Abhandlung von einem Fermentgehalte: F = $^1/_{100}$ oder $^1/_{500}$ u. s. w. spreche, soll dies bedeuten, dass der aus 1 Cc. Glycerinextract mit 10 Cc. 97-procentigem Alkohol erhaltene Niederschlag in 100, resp. 500 u. s. w. Cc. Wasser gelöst wurde. Da die Verdünnung mit Wasser stets vor dem Fermentzusatze geschah, beziehen sich alle Angaben über den Wassergehalt (W) auf das Gemisch von Milch und Wasser vor dem Zusatze von Fermentlösung; und die Verkürzung W = $^1/_5$, $^1/_{10}$ u. s. w. bedeutet also, dass in dem fraglichen Gemische auf 1 Vol. Wasser 4 resp, 9 Vol. Milch enthalten waren.

Nach diesen vorausgeschickten Bemerkungen kann ich zu den Versuchen übergehen.

Die zu diesem Versuche benutzte Milch enthielt 2,96 % Caseïn und 0,360 % Erdphosphate. Von der Fermentlösung, F = $^1/_{400}$, kamen auf je 10 Cc. des Gemisches von Milch und Wasser 2 Cc. Die Temperatur war 38,5—39° C. Ich lege hier die Versuchsergebnisse möglichst kurz dar.

	Menge des zugesetzten Wassers.	*Gerinnungszeit.*
1.	W = 0	0 Stund. 1 Min. 30 Sec.
2.	W = $^1/_{40}$	0 » 2 »
3.	W = $^1/_{30}$	0 » 2 »
4.	W = $^1/_{20}$	0 » 3 »
5.	W = $^1/_{10}$	0 » 3 » 30 Sec.
6.	W = $^1/_5$	0 » 7 »
7.	W = $^1/_4$	0 » 17 »
8.	W = $^1/_3$	0 » 52 »
9.	W = $^1/_2$	2 » 13 »
10.	W = $^2/_3$	Keine Gerinnung innerhalb 9 Stunden, die Reaction schwach sauer. Im Laufe der Nacht waren alle 3 Proben reichlich geronnen. Die Reaction stark sauer.
11.	W = $^3/_4$	
12.	W = $^4/_5$	

Der Versuch lehrt also, dass die Verdünnung mit Wasser eine sehr gerinnungswidrige Wirkung ausüben kann. Zwar wirken in dieser Beziehung kleine Wasserzusätze nur wenig, bisweilen sogar nicht nachtheilig, aber selbst bei Verdünnung mit nur dem gleichen Vol. Wasser giebt sich diese Wirkung in sehr schlagender Weise kund und bei noch grösseren Verdünnungen bleibt die Labgerinnung gänzlich aus. Statt der Coagulation des Caseïns findet nämlich in diesem Falle die Aus-

fällung desselben durch eine Milchsäuregährung statt, und die gerinnungshemende Wirkung der Verdünnung mit Wasser kann desshalb auch in noch schlagender Weise durch Versuche mit milchzuckerfreien Caseïnlösungen gezeigt werden.

Unter diesen Umständen, und da der eben angeführte Versuch schlagend genug ist, halte ich es nicht für nöthig, noch andere, ganz analoge Verdünnungsversuche mit Milch anzuführen, sondern ich gehe zu den Versuchen mit Lösungen von reinem Caseïn über.

Die Lösungen von reinem Caseïn wurden in der Weise bereitet, dass ich eine abgewogene Menge des bei 100° C. oder in Vacuo über Schwefelsäure getrockneten Caseïns in Kalkwasser löste und darauf eine sehr verdünnte Phosphorsäure zusetzte. Dabei wurde nicht auf ein Mal die gesammte Menge Kalkwasser zugesetzt, sondern ich verfuhr so, dass ich das Caseïn erst in nur wenig Kalkwasser löste und darauf abwechselnd Kalkwasser und verdünnte Phosphorsäure zufügte bis eine in der Siedehitze nicht, mit Lab dagegen schön gerinnende Caseïnlösung erhalten wurde.

Da es, wegen des Nucleïngehaltes des Caseïns, nicht möglich ist, durch Eintrocknen der Lösung, Einäscherung des Rückstandes und Bestimmung der Phosphorsäure- und Kalkmenge der Asche den Gehalt einer Caseïnlösung an Calciumphosphat genau zu ermitteln, so verfuhr ich, um den Gehalt meiner Lösung an Caseïn, Kalk und Phosphorsäure zu bestimmen, in der Weise, dass ich das Caseïn in einer abgemessenen Menge Kalkwasser löste, diese Lösung mit ebenfalls genau abgemessenen Mengen von Kalkwasser und verdünnter, mit Uranlösung titrirter Phosphorsäure versetzte, die fertige Lösung in ein graduirtes Gefäss überführte und durch Nachspülen mit Wasser auf ein genau bestimmtes Volum brachte. Von dieser Lösung, deren Gehalt an Phosphorsäure also genau bekannt war, wurde ein genau abgemessenes Volum eingetrocknet, der Rückstand gewogen, eingeäschert, der Gewichtsverlust als Caseïn berechnet und zuletzt die Menge des Kalkes durch Fällung mit Oxalsäure und Titration mit Chamäleon bestimmt. Abgesehen davon, dass bei Anwesenheit von Calciumcarbonaten und Phosphaten die Menge des Caseïns durch Einäscherung, selbst wenn der Glührückstand mit Ammoniumcarbonat behandelt wird, nicht genau bestimmt werden kann, entsteht bei diesem Verfahren ein (ganz zu vernachlässigender) Fehler dadurch, dass bei der wiederholten Prüfung der Caseïnlösung gegen Wärme und Lab ein Theil der Lösung verloren gehen muss. Da ich indessen diese Prüfung stets in der Weise ausführe, dass ich jedesmal

nur ein paar Tropfen der Caseïnlösung auf einem Uhrgläschen erhitze, resp. mit Lab gelinde erwärme, und da ich es nach einiger Uebung so weit gebracht habe, dass ich zu einer solchen Prüfung im Ganzen höchstens $^1/_2$ Cc. der oft 150—200 Cc. betragenden Versuchsflüssigkeit verwende, muss der bei der Berechnung des Phosphorsäuregehaltes (welcher übrigens nie mehr als 0,1 % betrug) vielleicht entstehende Fehler nur ein sehr kleiner, gar nicht in Betracht kommender werden. Wenn ich sämmtliche zugesetzte Phosphorsäure als neutrales Calciumphosphat, $Ca_3P_2O_8$, berechnete, blieb doch ohne Ausnahme stets in den Caseïnlösungen ein nicht unbedeutender Rest von Kalk übrig, welcher wahrscheinlich theils als Carbonat und theils als Caseïnverbindung in den Lösungen enthalten war.

In der nun angegebenen Weise wurden die Lösungen von reinem Caseïn stets bereitet und deren Gehalt an Caseïn, Kalk und Phosphorsäure bestimmt. Ich führe desshalb in dem Folgenden — gleichgültig. ob es um Verdünnungs- oder andere Versuche sich handelt — einfach die Zusammensetzung der Lösungen an. Die Verdünnungsversuche sind in ganz derselben Weise wie die entsprechenden Versuche mit Milch ausgeführt worden, und da sie alle übereinstimmende Resultate gegeben haben, ist es gewiss genügend, nur den folgenden Versuch anzuführen.

Die Caseïnlösung enthielt 3,705 % Caseïn, 0,112 % CaO und 0,054 % Phosphorsäure (P_2O_5). Von der Fermentlösung, F = $^1/_{100}$, kamen auf je 10 Cc. Versuchsflüssigkeit 2 Cc. Die Temperatur schwankte zwischen 36 und 37° C. Der Wassergehalt W bezieht sich auf die Versuchsflüssigkeit vor dem Fermentzusatze. Die Versuchsergebnisse waren folgende.

	Menge des zugesetzten Wassers.	*Gerinnungszeit.*
1.	W = 0	0 Stund. 0 Min. 45 Sec.
2.	W = $^1/_5$	0 » 1 » 30 »
3.	W = $^1/_4$	0 » 2 »
4.	W = $^1/_3$	0 » 5 »
5.	W = $^1/_2$	3 » 10 »
6.	W = $^2/_3$	Keine Gerinnung inner-
7.	W — $^3/_4$	halb 24 Stunden.

Zusatz von Wasser zu einer Lösung von Caseïn und Kalksalzen in Wasser übt also einen sehr mächtigen Einfluss auf die Gerinnung aus, wenn auch dieser Einfluss erst bei Zusatz von grösseren Wassermengen in schlagendster Weise zur Geltung gelangt. Durch Zusatz von einer genügenden Wassermenge ist es also sogar möglich, die Gerinnungsfähigkeit einer Caseïnlösung gänzlich zu vernichten, ohne dass dabei ir-

gend ein Stoff aus der Lösung entfernt oder die Relation zwischen Caseïn und Kalksalzen geändert wird, und es ist also leicht ersichtlich, dass das erste, von Schmidt gegen die gerinnungsvermittelnde Wirkung der Kalksalze angeführte Argument von keiner Bedeutung sein kann. Bei der Dialyse gehen nämlich nicht nur Erdphosphate und — bei Anwendung von dem Schmidt'schen geleimten Papiere — Caseïn in die Diffusate über, sondern es geht auch umgekehrt Wasser in die Milch über und die Dialyse wirkt also wie eine starke Verdünnung mit Wasser. In der That war auch in dem von Schmidt angeführten Versuche nach 30-stündiger Dialyse die Menge des Eiweisses fast auf die Hälfte und die Menge der Erdphosphate fast auf ein Viertel der ursprünglichen Mengen herabgesunken, und diese Versuche von Schmidt beweisen also gar nichts gegen die gerinnungsvermittelnde Wirkung der Kalksalze.

Eine andere Beobachtung Schmidts, derzufolge die, nach Entfernung aller löslichen Salze durch Dialyse, während der Umwandlung der Milch aus einer gegen die Labwirkung sehr empfindlichen in eine nicht mehr coagulirbare Flüssigkeit getrennt gesammelten und concentrirten Diffusate, welche nur eine geringe Menge der Erdphosphatverbindungen aber auch keine Alkalisalze enthalten, unwirksam sein sollen, beweist ebenfalls gar nichts gegen die Bedeutung der Kalksalze für die Gerinnung. Wenn man das Caseïn in Kalkwasser löst und mit sehr verdünnter Phosphorsäure neutralisirt, wird man nämlich sogleich finden, dass nicht nur die Anwesenheit von Erdphosphaten überhaupt sondern vielmehr die Anwesenheit von einer nicht zu kleinen Menge dieser Salze, ein für die Gerinnung nothwendiges Bedingniss ist, und wenn man des oben bezüglich der Wirkung von Verdünnung mit Wasser Gesagten sich erinnert, ist es leicht verständlich, warum der durch Dialyse wasserreicher und bedeutend caseïnärmer gewordenen Milch nicht durch weiteres Verdünnen mit den zwar concentrirten, aber doch nur eine geringe Menge der Erdphosphatverbindungen enthaltenden Diffusaten die Gerinnungsfähigkeit wiedergegeben werden konnte.

Gegen eine gerinnungsvermittelnde Wirkung der Kalksalze spricht vielmehr die Angabe Schmidts, dass die Wirksamkeit der aus saurer Milch erhaltenen Diffusate sich noch erhalten soll, wenn die Erdphosphatverbindungen durch Kochen mit Alkohol gefällt und die Filtrate im Wasserbade bis zur vollständigen Entfernung des Alkohols eingeengt werden. Es ist sehr zu bedauern, dass Schmidt es nicht für nöthig erachtet hat, diese Behauptung durch einen Versuch oder irgend einige Detailangaben zu beweisen, und es ist dies um so mehr zu bedauern,

als es mir trotz mehrmals wiederholter Versuche noch nie gelungen ist, diese Angaben von Schmidt zu bestätigen.

Schmidt sagt nur, dass er die aus saurer Milch erhaltenen Diffusate durch Kochen mit Alkohol gefällt und die Filtrate im Wasserbade bis zur vollständigen Entfernung des Alkohols verdunstet hatte, aber er spricht gar nicht von einer Neutralisation in diesem Falle. Es ist nun offenbar, dass ohne eine genaue Neutralisation der Diffusate diese Versuche ganz werthlos sind, und ich kann also gar nicht glauben, dass Schmidt die Neutralisation unterlassen habe. Im Gegentheil will ich gerade von der Voraussetzung ausgehen, dass Schmidt die Diffusate wirklich neutralisirt hat; aber auch in diesem Falle entsteht die wichtige Frage, wann die Neutralisation ausgeführt wurde. Hat Schmidt die Diffusate vor dem Fällen mit Alkohol, resp. vor dem Verdunsten des letzteren, oder erst nach dem Verdunsten des Alkohols neutralisirt, und hat er im ersteren Falle auch die Reaction der vom Alkohol befreiten concentrirten Lösung geprüft, resp. nöthigenfalls corrigirt? Es wäre sehr wichtig dies zu wissen, denn eine vor dem Fällen mit Alkohol oder vor dem Verdunsten des letzteren stattfindende Neutralisation ist nicht genügend. Es ist mir nämlich mehrmals begegnet, dass die, vor dem Fällen mit Alkohol, mit Alkali zu amphoterer Reaction versetzte Flüssigkeit während der Verdunstung des Alkohols wieder eine saure Reaction angenommen hatte, und in diesem Falle gerann auch das Gemisch von concentrirtem Diffusat und Caseïnlösung [1]) leicht, bisweilen sogar ohne Labzusatz. Wenn ich dagegen die vom Alkohol befreite, concentrirte Flüssigkeit erst wiederum neutralisirt hatte, erwies sie sich auch als ganz wirkungslos.

Uebrigens sagt Schmidt zwar, dass er die Erdphosphatverbindungen durch Kochen mit Alkohol ausgefällt hat, aber es folgt daraus noch nicht, dass er dadurch auch allen Kalk ausgefällt hätte. Mir ist es wenigstens nicht gelungen, durch Erhitzen zum Kochen mit dem 10-fachen Vol. 97-procentigen Alkohols alle Kalkerde zu entfernen. Nach der Filtration und dem Verjagen des Alkohols konnte ich nämlich stets Spuren von Kalk nachweisen, was vielleicht daher rührte, dass die Diffusate neben phosphorsaurem auch in Alkohol, besonders in heissem,

---

[1]) Zu diesen Versuchen habe ich im Allgemeinen nicht durch Dialyse gerinnungsunfähig gewordene Milch, sondern — um reinere Resultate zu erhalten — möglichst neutrale Lösungen von Caseïnnatron verwendet. In jedem Versuche überzeugte ich mich dabei, vor dem Fällen mit Alkohol, von der Fähigkeit der neutralisirten Diffusate, mit diesen Caseïnlösungen schön mit Lab gerinnende Gemische zu geben.

löslichen milchsauren Kalk enthielten. Es ist möglich, dass die Diffusate unter verschiedenen Verhältnissen eine verschiedene Menge von milchsaurem Kalk enthalten können, und da, wie ich durch besondere Versuche ermittelt habe, der gährungsmilchsaure Kalk eine entschieden gerinnungsvermittelnde Wirkung ausüben kann, muss man bei diesen Versuchen die Aufmerksamkeit nicht nur auf die Erdphosphate sondern auch auf den etwa vorhandenen milchsauren Kalk richten. In meinen Versuchen war indessen die in den Filtraten zurückgebliebene Kalkmenge eine so geringe, dass die erst neutralisirten, dann mit Alkohol gefällten, darauf filtrirten, concentrirten und nöthigenfalls wiederum neutralisirten Diffusate gegenüber der Labgerinnung als ganz unwirksam sich erwiesen.

Wie aus dem Obigen ersichtlich ist, wird es also, wegen des Mangels an detaillirten Angaben in Schmidts Abhandlung, kaum möglich, den Werth seiner Angabe zu beurtheilen. Da ich aber, wenn ich nur für eine neutrale Reaction und eine Ausfällung der Kalksalze bis auf verschwindend kleine Spuren Sorge getragen hatte, in keinem einzigen Versuche ein nach dem Fällen mit Alkohol gegenüber der Labwirkung noch wirksames Filtrat erhalten habe, kann ich auch dieser Angabe Schmidts keine Beweiskraft gegenüber der von mir festgestellten, gerinnungsvermittelnden Wirkung der Kalksalze zumessen.

Dagegen werden die übrigen Angaben Schmidts erst dann leicht erklärlich, wenn man von der gerinnungsvermittelnden Wirkung der Kalksalze ausgeht. Dass (vergl. Schmidt pag. 41) sowohl die coagulable als die dieser Eigenschaft durch Dialyse beraubte Milch bei qualitativer Untersuchung ziemlich beträchtliche Mengen von Erdphosphaten enthielt, lässt sich — abgesehen davon, dass in dem von Schmidt angeführten Versuche die Menge der Erdphosphate, wie die quantitative Bestimmung zeigte, durch Dialyse auf ein Viertel der ursprünglichen Menge herabgesunken war — leicht, wie schon oben gezeigt wurde, durch die in Folge der Dialyse stattgefundene Verdünnung mit Wasser erklären. Die Gerinnungsunfähigkeit trotz der Anwesenheit von Erdphosphaten hängt nämlich von dem geringen Gehalte der dialysirten Milch an solchen Salzen wie auch von dem kleinen Caseïn- und dem grossen Wassergehalte derselben ab.

Dass die Gerinnungsfähigkeit des mit Essigsäure gefällten Caseïns erst durch ein mehrere Male wiederholtes Ausfällen und Wiederauflösen verloren geht, steht in vorzüglicher Uebereinstimmung mit der That-

sache, dass die Erdphosphate erst durch wiederholtes Ausfällen des Caseïns entfernt werden können.

Auch die unzweifelhaft sehr auffallende Beobachtung Schmidts, dass nur die *während der Dialyse* sauer gewordenen Diffusate gerinnungsvermittelnd wirken sollen, lässt sich sehr schön mit der gerinnungsvermittelnden Wirkung der Kalksalze vereinbaren. Wenn die Milch während der Dialyse sauer wird, muss nämlich eine reichliche Menge von Erdphosphaten nicht nur aus der Verbindung mit dem Caseïn freigemacht werden sondern auch in die Diffusate übergehen können. Hierzu kommt noch der sehr wichtige Umstand, dass das Sauerwerden der Milch während der Dialyse in Schmidts Versuchen nur bei Anwendung von Pergamentpapier stattfand. Durch solches Papier diffundirt nämlich bedeutend weniger Eiweiss als durch geleimtes Papier, und da das in die Diffusate übergegangene Eiweiss bei der Concentration der Diffusate gerinnt und dabei die Erdphosphate mit niederreisst, müssen auch die mit Leimpapier erhaltenen, eiweissreichen Diffusate nach der Concentration bedeutend ärmer an Erdphosphaten als die mit Pergamentpapier erhaltenen werden. Dem ist auch so, und die Menge der von Schmidt in dem concentrirten, filtrirten Diffusate von während der Dialyse sauer gewordenen Milch gefundenen Erdphosphate war etwa 4 Mal so gross wie die, welche von ihm in dem mit Leimpapier, von der während der Dialyse nicht sauer gewordenen Milch, erhaltenen Diffusate gefunden wurde. Es ist also leicht begreiflich, warum gerade die während der Dialyse sauer gewordene Milch die wirksamen Diffusate liefert, und es ist ebenso leicht begreiflich, warum weder eine nachträgliche Säuerung etwas nützen noch die Wärme den gerinnungsvermittelnden Stoff vernichten kann.

Die Angaben von Alexander Schmidt sind also nicht mehr dunkel sondern im Gegentheil leicht verständlich. Mit der von mir bewiesenen gerinnungsvermittelnden Wirkung der Erdphosphate stehen sie nicht nur nicht im Widerspruche sondern vielmehr im besten Einklange, und diese Wirkung der Kalksalze muss ich also fortwährend als eine ganz sicher festgestellte Thatsache betrachten.

Für die Gerinnung des Caseïns mit Lab ist also, abgesehen von dem Caseïn und dem Fermente, die Anwesenheit von einer genügenden Menge Calciumphosphat ein nothwendiges Bedingniss, wobei doch nicht zu übersehen ist, dass die Phosphorsäure auch durch andere Säuren, wie Schwefelsäure oder Kohlensäure, und der Kalk durch andere alkalische Erden, wie Baryum, Strontium und Magnesium ersetzt werden kann. Die

Bedeutung der Erdsalze für die Gerinnung liegt, wie ich schon in einer früheren Abhandlung behauptet habe, nicht darin, dass sie die chemische Wirkung des Ferments vermitteln, wenn sie auch nicht ohne Einfluss auf die fermentative Umsetzung selbst sind, sondern darin, dass die Ausscheidung eines Gerinnsels erst durch sie bedingt wird. Man muss nämlich bei der Caseïn- wie bei der Fibrinogengerinnung scharf zwischen der durch Fermentwirkung vermittelten, chemischen Umwandlung des Gerinnungssubstrates (des Caseïns, resp. des Fibrinogens) und dem Auftreten eines Gerinnsels in der Flüssigkeit unterscheiden. Die chemische Umsetzung des Gerinnungssubstrates kann sehr wohl stattfinden, ohne dass sie durch eine Gerinnung oder irgend eine andere sichtbare Veränderung der Versuchsflüssigkeit sich kund giebt, und die Caseïngerinnung mit Lab ist besonders dazu geeignet, dies zu zeigen. Man kann nämlich zeigen, einerseits, dass die durch Lab vermittelte, chemische Umsetzung des Caseïns auch bei vollständiger Abwesenheit von Kalksalzen und ohne irgend eine sichtbare Veränderung der Flüssigkeit von Statten gehen kann, und andererseits, dass die Ausscheidung des fermentativen Umwandlungsproduktes, also die Gerinnung der Flüssigkeit, durch die Unfähigkeit des Käses das Calciumphosphat zu lösen, resp. von dem letzteren in Lösung gehalten zu werden, bedingt ist. Um das von mir zu diesem Zwecke gewöhnlichenfalls eingeschlagene Verfahren dem Leser leicht verständlich zu machen, scheint es mir am besten zu sein, hier einen Versuch anzuführen. Ich will dabei nur die Bemerkung vorausschicken, dass es bei dem Wiederholen von diesem Versuche nicht nothwendig ist, stets mit Lösungen von den hier nur beispielsweise angeführten Concentrationen zu arbeiten. Ich habe mehrmals ähnliche Versuche mit Lösungen von anderem Chlorcalcium- und Natriumphosphatgehalte ausgeführt.

Von einer Natriumphosphatlösung, welche 0,55 % Na_2HPO_4 enthielt, wurden 50 Cc. abgemessen und darin 6 Gm. bei 100° C. getrockneten, reinen Caseïns gelöst. Von dieser Lösung wurden 2 Proben auf je 20 Cc. abgemessen und die eine *a* mit 1 Cc. Fermentlösung, F = $^1/_{100}$, versetzt. Darauf wurden beide Proben in einem Wasserbade auf 37° C. erwärmt. Da nach Verlauf von einer halben Stunde in keiner Probe eine sichtbare Veränderung stattgefunden hatte, wurden beide Proben herausgehoben und die Probe *a*, um das Ferment zu zerstören, gekocht. Die andere Probe *b* wurde auch der Controle halber gekocht und darauf mit 1 Cc. derselben aber vorher gekochten Fermentlösung versetzt. Nach dem vollständigen Erkalten wurden beide Proben mit je 20 Cc.

einer Chlorcalciumlösung von 0,44 % $CaCl_2$ versetzt. Dabei konnte die Pobe *b* allmählich mit der ganzen Menge $CaCl_2$-lösung versetzt werden, ohne dass ein bleibender Niederschlag entstand; es wurde wie gewöhnlich eine weisse Flüssigkeit von dem Aussehen der abgerahmten Milch erhalten. In der Probe *a* dagegen, welche der Wirkung des Fermentes ausgesetzt worden war, entstand schon nach Zusatz von nur wenig $CaCl_2$-lösung ein bleibender Niederschlag und nach Zusatz von 20 Cc. war das Ganze in einen dicken Brei von zerrührtem Käse verwandelt.

Dieser Versuch lehrt also, dass trotz der Abwesenheit von Kalksalzen in der Probe *a* eine fermentative Umwandlung des Caseïns in Käse (Caseum) in dieser Probe stattgefunden hatte, und das Auftreten der Gerinnung erst nach dem Zusatze von $CaCl_2$ rührte daher, dass das in Natriumphosphat lösliche, in Calciumphosphat dagegen unlösliche oder wenigstens schwerlösliche Produkt der fermentativen Umwandlung des Caseïns (der Käse) durch Zusatz von $CaCl_2$ seines Lösungsmittels beraubt wurde. Die Rolle der Erdphosphate ist also hauptsächlich die, das Auftreten eines Gerinnsels zu ermöglichen; aber wenn die Kalksalze auch kein nothwendiges Bedingniss für die chemische Umsetzung des Caseïns darstellen, werden wir doch später finden, dass sie nicht nur auf die Ausscheidung des Käses sondern auch auf den fermentativen Vorgang selbst einen mächtigen Einfluss ausüben können.

Der Käse unterscheidet sich von dem Caseïn nicht nur durch die Unfähigkeit grössere Mengen von Calciumphosphat in Lösung zu halten, resp. von demselben gelöst zu werden, sondern auch — wenigstens gilt dies von dem unter gewöhnlichen Versuchsbedingungen erhaltenen Käse — durch eine im Allgemeinen geringere Löslichkeit. Nachdem wir nun oben die Unabhängigkeit der chemischen Umsetzung von der Anwesenheit von Kalksalzen kennen gelernt haben, kann man also fragen, ob es doch nicht möglich sein würde, eine auch bei Abwesenheit von Kalksalzen gerinnende Caseïnlösung zu bereiten. Wenn nämlich der Käse auch in Alkalien schwerlöslicher als das Caseïn ist, muss wohl wahrscheinlich die für die Lösung des Caseïns eben genügende, kleinste Alkalimenge eine für die Lösung der entsprechenden Menge Käse ungenügende sein, und dementsprechend würde auch eine mit möglichst wenig Alkali bereitete Caseïnlösung durch Lab gefällt werden können.

Um über diese Frage zu entscheiden, habe ich einige Versuche angestellt, aber trotzdem, dass ich zu der Auflösung des Caseïns so wenig Alkali verwendete, dass die Lösungen eine entschieden saure Reaction besassen, und trotzdem, dass ich diese Lösungen in einigen Fällen

sogar durch Dialyse noch weiter reinigte, ist es mir noch nicht gelungen, eine Lösung von reinem Caseïn in möglichst wenig Alkali durch Lab zu coaguliren. Für die Erklärung dieses Versuchsergebnisses bieten sich offenbar mehrere Möglichkeiten dar; aber ich habe noch nicht Zeit gehabt, diese Frage zum Gegenstande einer ausführlichen Untersuchung zu machen, und die Zahl der von mir bisher ausgeführten Versuche ist übrigens keine so grosse, dass ich es wagen sollte, die Gerinnungsfähigkeit der mit möglichst wenig Alkali bereiteten Caseïnlösungen gänzlich in Abrede zu stellen.

Es wird, als etwas für die Fermente Charakteristisches, oft angegeben, dass sogar fast verschwindend kleine Mengen von ihnen ungemein grosse Mengen eines anderen Stoffes chemisch umsetzen können, und auch in dieser Hinsicht sind die Versuche mit Caseïn und Lab sehr belehrend. Ich will dies mit einem Beispiele zeigen. Von dem oft erwähnten Glycerinextracte, welches 0,25 % mit dem 10-fachen Volumen 97-procentigen Alkohols fällbare Substanz enthielt, wurden 4 Cc. mit Alkohol gefällt, der Niederschlag rasch auf ein Filtrum gebracht, mit Alkohol nachgewaschen, ausgepresst und zuletzt in 100 Cc. Wasser gelöst. Von dieser Lösung, welche also höchstens 0,010 % feste Stoffe enthielt, wurde 1 Cc. mit 99 Cc. Wasser verdünnt und also eine neue Lösung, mit einem Gehalte von höchstens 0,0001 % festen Stoffen, erhalten. Von dieser Lösung wurden 2 Cc. mit 20 Cc. einer in der Wärme allein nicht gerinnenden Caseïncalciumphosphatlösung, mit einem Gehalte von 4,2 % Caseïn, gemischt und im Wasserbade auf 37,5 —38° C. erwärmt. Nach Verlauf von etwa 1 St. 15 Min. war das Gemisch so vollständig geronnen, dass in den klaren Molken kein unverändertes Caseïn nachzuweisen war.

Die zu dem Gerinnungsversuche verwendete Fermentlösung enthielt nach dem Obigen höchstens 0,0001 % feste Stoffe, und die absolute Menge von festen Stoffen in den zu dem Versuche verwendeten 2 Cc. betrug also 0,000002 Gm. Die Caseïnlösung enthielt 4,2 % Caseïn und die absolute Menge Caseïn in den zu dem Versuche verwendeten 20 Cc. Caseïnlösung war also 0,840 Gm. In diesem Falle wurden also durch 1 Gewichtstheil Lab nicht weniger wie 420000 Gewichtstheile Caseïn coagulirt. Nun ist aber zu bedenken, dass der mit Alkohol in dem Glycerinextracte erzeugte Niederschlag nicht nur das Labferment, sondern auch Pepsin und Eiweiss enthielt; und es kann also wahrscheinlich höchstens nur die Hälfte von dem mit Alkohol erzeugten Niederschlage als Lab berechnet werden. Unter dieser Voraussetzung würden also 800000 Gewichtstheile Caseïn von 1 Gewichtstheil Lab coagulirt werden

können, und doch ist, wie ich glaube, die Grenze damit noch nicht erreicht worden.

Ich habe schon behauptet, dass die Kalksalze nicht nur auf die Ausscheidung des Käses sondern auch auf den fermentativen Vorgang selbst einwirken können, und diese letztere Wirkung giebt sich in schlagender Weise kund durch eine ausserordentlich grosse Beschleunigung der Gerinnung. Als Belege für diese Behauptung will ich hier einige Versuche anführen.

Zu diesen Versuchen bereitete ich mir eine Reihe von $CaCl_2$-lösungen verschiedener aber genau bekannter Stärke, setzte von diesen Lösungen der Milch, resp. der Caseïnlösung genau abgemessene Mengen zu und verdünnte dann, wenn nöthig, mit so viel Wasser, dass alle Proben, mit Ausnahme von dem ungleichen Chlorcalciumgehalte, durchaus dieselbe Zusammensetzung hatten. Da die Gerinnung mit Lab nach einem passenden Chlorcalciumzusatze schon bei Zimmerwärme sehr rasch von Statten geht, wurden die Proben weder vor noch nach dem Labzusatze erwärmt, und die Versuche wurden also bei Zimmerwärme ausgeführt. Als Controle diente eine zweite Reihe von in derselben Weise angeordneten Proben ohne Fermentzusatz. Die Angaben über den Procentgehalt an $CaCl_2$ beziehen sich auf die Versuchsflüssigkeit vor dem Fermentzusatze. In Bezug auf die Bestimmung der Menge des Caseïns und der Erdphosphate in der Milch, resp. der Caseïnlösung, wie in Bezug auf die Beschaffenheit der Fermentlösungen etc., gilt das bei den oben angeführten Versuchen schon Gesagte. Ich führe hier zuerst einen mit Kuhmilch ausgeführten Versuch an.

Die Milch enthielt 2,53 % Caseïn und 0,345 % unlösliche Salze. Die durch Zusatz von $CaCl_2$-lösung und Wasser in jeder Probe stattgefundene Verdünnung der Milch mit Wasser war: W = $^1/_3$. Von der Fermentlösung, F = $^1/_{200}$, kam auf je 10 Cc. Versuchsflüssigkeit nur 1 Cc. Die Temperatur war während der ersten 2 Stunden ziemlich constant 14° C., stieg aber während der folgenden 5 Stunden auf 17° C. und fiel wiederum während der nächsten 2 Stunden auf 15° C. herab. Am folgenden Tage, nach Verlauf von 24 Stunden, war die Zimmertemperatur 13,5° C.

	Gehalt der Versuchsflüssigkeit an $CaCl_2$.	*Gerinnungszeit.*
1.	0,000 % $CaCl_2$	Nach 24 Stunden keine Gerinnung } Reaction amphoter
2.	0,010 » »	Nach 24 Stunden keine Gerinnung } aber überwieg. sauer.
3.	0,020 » »	Gerinnung nach 8 Stund. 30 Min. (Reaction amphoter).
4.	0,050 » »	» » 0 » 46 »
5.	0,100 » »	» » 0 » 4 »
6.	0,500 » »	» » 0 » 1 »

7.	1,000 % $CaCl_2$	....	Gerinnung	nach	0	Stund.	3	Min.	
8.	5,000 » »	....	»	»	0	»	8	»	
9.	10,000 » »	....	»	»	0	»	20	»	

In keiner der Controleproben war nach Verlauf von 24 Stunden eine Gerinnung sichtbar.

Der nun angeführte Versuch zeigt also in schlagendster Weise die gerinnungsbeschleunigende Wirkung des Chlorcalciums und er lehrt weiter, dass diese Wirkung nur bis zu einem gewissen Grade mit der Menge des zugesetzten Chlorcalciums zunimmt, um von da ab wieder abzunehmen. Das Optimum lag in diesem Versuche bei etwa 0,5 % $CaCl_2$.

Die gerinnungsbeschleunigende Wirkung des Chlorcalciums tritt auch bei Anwendung von reinen Caseïnlösungen sehr shön hervor, und um dies zu zeigen, führe ich hier noch 2 Versuche mit einer Lösung von reinem Caseïn an.

Die Caseïnlösung enthielt 2,86 % Caseïn, 0,164 % $Ca_3P_2O_8$ und 0,054 % CaO. Sie gerann nicht in der Wärme allein sondern erst nach Zusatz von Lab. Die durch Zusatz von $CaCl_2$-lösung und Wasser in jeder Probe stattgefundene Verdünnung der Caseïnlösung mit Wasser war: $W = 1/4$. Von der Fermentlösung, $F = 1/500$, kam auf je 10 Cc. der Versuchsflüssigkeit 1 Cc. Die Temperatur in den Versuchsflüssigkeiten schwankte während der 4 ersten Stunden nur zwischen 15° C. und 16,5° C.

	Gehalt der Versuchsflüssigkeit an $CaCl_2$.		*Gerinnungszeit.*						
1.	0,000 % $CaCl_2$	....	Gerinnung	nach	3	Stund.	40	Min.	
2.	0,010 » »	....	»	»	0	»	42	»	
3.	0,020 » »	....	»	»	0	»	10	»	
4.	0,040 » »	....	»	»	0	»	6	»	
5.	0,080 » »	....	»	»	0	»	4	»	
6.	0,160 » »	....	»	»	0	»	3	»	
7.	0,320 » »	....	»	»	0	»	4	»	
8.	0,640 » »	....	»	»	0	»	6	»	30 Sec.
9.	1,280 » »	....	»	»	0	»	19	»	
10.	2,560 » »	....	»	»	0	»	38	»	
11.	5,000 » »	....	»	»	0	»	58	»	

Da die reinen Caseïnlösungen stets weit rascher als die Milch mit Lab gerinnen, wird der Unterschied zwischen der chlorcalciumfreien Probe und den chlorcalciumhaltigen nicht so gross wie in dem vorigen Versuche mit Milch, aber nichtsdestoweniger ist auch in diesem Versuche der Unterschied so ausserordentlich gross, dass, während die chlorcalciumfreie Probe Nr. 1 erst nach 3 St. 40 Min. gerann, diejenige Probe dagegen, welche 0,160 % $CaCl_2$ enthielt, schon innerhalb 3 Minuten geronnen war. Auch in diesem Falle zeigte es sich also, dass die Wir-

kung des Chlorcalciums nur zu einem gewissen Grade mit steigenden Chlorcalciummengen zunimmt und von da ab wieder abnimmt. Diese Wirkung des Chlorcalciums macht sich noch geltend bei sehr grosser Verdünnung der Caseïnlösungen mit Wasser, und es ist sogar möglich, die schädliche Einwirkung von Verdünnung mit Wasser durch Zusatz von $CaCl_2$ gänzlich aufzuheben. Folgender Versuch wird dies zeigen.

Dieselbe Caseïnlösung wie zu dem vorigen Versuche aber mit so viel $CaCl_2$-lösung und Wasser verdünnt, dass in jeder Probe der Zusatz von Wasser, $W = {}^7/_8$, war. Von der Fermentlösung, $F = {}^1/_{200}$, kamen auf je 10 Cc. Versuchsflüssigkeit 2 Cc. Die Temperatur der Versuchsflüssigkeiten schwankte während der ersten 6 Stunden zwischen 17 und 18° C. Am folgenden Tage schwankte die Temperatur in der noch nicht geronnenen Probe, 1, zwischen 17 und 15° C. Nur die Probe 2 wurde erwärmt.

	Gehalt der Versuchsflüssigkeit an $CaCl_2$.	*Gerinnungszeit.*
1.	0,000 % $CaCl_2$	Keine Gerinnung bei Zimmerwärme innerhalb 48 St.
2.	0,000 » »	Keine Gerinnung bei 38—40° C. innerhalb 48 St.
3.	0,010 » »	Keine Gerinnung bei Zimmerwärme innerhalb 48 St.
4.	0,020 » »	Keine Gerinnung binnen 6 St. Gerinnung während der Nacht.
5.	0,040 » »	Gerinnung nach 1 Stund. 40 Min.
6.	0,080 » »	» » 0 » 5 » 30 Sec.
7.	0,160 » »	» » 0 » 1 »
8.	0,320 » »	» » 0 » 1 »
9.	0,640 » »	» » 0 » 3 »
10.	1,280 » »	» » 0 » 11 »
11.	2,560 » »	» » 0 » 35 »
12.	5,000 » »	» » 1 » 30 »

In diesem Versuche trat also die gerinnungsbeschleunigende Wirkung des Chlorcalciums in schönster Weise hervor, und die Gerinnung wurde sogar überhaupt erst durch Zusatz von $CaCl_2$ ermöglicht. Dass es in diesem Versuche ebenso wenig wie in dem vorigen und den übrigen von mir angestellten nur um eine blosse Ausfällung des unveränderten Caseïns durch das $CaCl_2$ sich handelte, zeigten die Controleversuche. Da, wie aus diesem Versuche hervorgeht, die schädliche Wirkung von Verdünnung mit Wasser durch Zusatz von einem Kalksalze wieder aufgehoben werden kann, dürfte es wohl erlaubt sein, anzunehmen, dass das Ausbleiben der Gerinnung nach stärkerer Verdünnung der Milch, resp. der Caseïnlösung, mit Wasser wenigstens zum Theil von der dadurch herbeigeführten Verminderung des Gehaltes an Kalksalzen herrühre.

Wie in dem vorigen Versuche lag auch in diesem das Optimum für das $CaCl_2$ bei etwa 0,2 %, und wie in allen anderen von mir ange-

stellten Versuchen mit diesem Salze trat auch in diesem eine mit wachsenden Mengen des Salzes erst rasch ansteigende und dann wieder abnehmende gerinnungsbeschleunigende Wirkung auf. Diese Wirkung des Chlorcalciums ist übrigens von Interesse auch wegen der Analogie, welche wie in anderen Hinsichten so auch in dieser zwischen der Caseïn- und der Fibrinogengerinnung besteht. Wie bei der Caseïngerinnung nimmt nämlich auch bei der Gerinnung des Fibrinogens — wie ich dies schon andererorts gezeigt habe — die Gerinnungsgeschwindigkeit mit steigenden Chlorcalciummengen bis zu einem gewissen Grade zu, um von da ab mit weiter gesteigerten Mengen stetig abzunehmen. Da die Wirkung des Chlorcalciums auf die Caseïngerinnung eine constante, leicht zu bestätigende, ist, halte ich es nicht für nöthig, weitere Versuche hier anzuführen.

Wenn also bezüglich der Wirkung von $Ca\,Cl_2$ eine grosse Übereinstimmung zwischen der Caseïn- und der Fibrinogengerinnung obwaltet, soll dagegen nach Alexander Schmidt in Bezug auf das Verhalten zu Alkalisalzen ein grosser Unterschied zwischen den beiden Processen bestehen. Während nämlich die Alkalisalze, nach Schmidts Ansicht, nothwendige Bedingungen für die s. g. Fasertoffgerinnung (die Gerinnung des Fibrinogens) darstellen, sollen sie dagegen für die Gerinnung des Caseïns ein Hinderniss abgeben.

Auf die Frage, in wie weit die neutralen Alkalisalze ein nothwendiges Bedingniss für die Fibrinogengerinnung darstellen, werde ich hoffentlich in einer anderen Abhandlung ausführlicher eingehen können, und ich will desshalb hier nur die von Schmidt für die hemmende Wirkung der neutralen Alkalisalze auf die Caseïngerinnung beigebrachten Beweise etwas näher ins Auge fassen.

Die von Schmidt angeführten Beweise sind folgende. Erstens hatte er gefunden, dass die Gerinnungsfähigkeit der Milch durch das Entfernen sämmtlicher Alkalisalze mittelst Dialyse eine Steigerung erfährt, während umgekehrt Zusatz von den concentrirten Diffusaten die Gerinnung verzögert oder gänzlich verhindert, und er hatte weiter auch beobachtet, dass Zusatz von einer concentrirten Kochsalzlösung in derselben Weise wie Zusatz von den Diffusaten wirkte.

Ohne dass ich damit eine hemmende Wirkung der neutralen Alkalisalze auf die Caseïngerinnung in Abrede stellen will, muss ich gestehen, dass ich diese Angaben von Alexander Schmidt unmöglich als Beweise gelten lassen kann. Dass die Milch durch das Entfernen der löslichen Salze eine gesteigerte Gerinnungsfähigkeit erlangen kann, beweist näm-

lich nicht, dass die auf die Fibrinogengerinnung vortheilhaft einwirkenden neutralen Alkalisalze eine hemmende Wirkung auf die Caseïngerinnung ausüben, denn dieser an sich gewiss richtigen Beobachtung kann auch eine ganz andere Erklärung gegeben werden. Schon in meiner ersten Caseïnabhandlung habe ich nämlich bei Besprechung derjenigen Umstände, welche einen Einfluss auf die Caseïngerinnung ausüben können, die Gegenwart von gewissen Salzen als ein die Gerinnung störendes Moment hervorgehoben, und ich bezeichnete dabei das auch auf die Fibrinogengerinnung nachtheilig einwirkende Alkaliphosphat als das — unter den von mir untersuchten Salzen — am schädlichsten wirkende. Ich fand sogar, dass schon eine geringe Menge eines amphoter reagirenden Gemisches von neutralem und saurem Alkaliphosphat die Gerinnung bedeutend verzögern oder sogar verhindern kann; und da die Milch den gang und gäben Vorstellungen gemäss auch Alkaliphosphate enthält, muss sie, selbst wenn sie keine neutralen Alkalisalze enthielte, nach dem Entfernen der Alkaliphosphate durch Dialyse eine gesteigerte Gerinnungsfähigkeit erlangen. Ob die Entfernung der neutralen, auf die Fibrinogengerinnung vortheilhaft einwirkenden Alkalisalze auch zum Theil die gesteigerte Gerinnungsfähigkeit der Milch bedingt habe, bleibt also durch die Dialyseversuche ganz unentschieden.

Dass ein Zusatz von den concentrirten Diffusaten die Gerinnung verzögerte oder gänzlich verhinderte, kann ich ebenso wenig als einen Beweis für eine gerinnungshemmende Wirkung der neutralen Alkalisalze gelten lassen. Abgesehen von dem Gehalte der Diffusate an Phosphaten muss nämlich schon die bei dem Zusatze von Diffusaten unvermeidliche Verdünnung der Milch an sich eine hemmende Wirkung entfalten, und Schmidt hat es gänzlich unterlassen, die durch die Verdünnung allein hervorgebrachte hemmende Wirkung durch Controleversuche gesondert zu bestimmen. Es bleibt also ganz unentschieden, in wie weit in Schmidts Versuchen die gerinnungshemmende Wirkung der Diffusatzusätze durch die Salze oder durch die Verdünnung hervorgebracht worden sei.

Die Beobachtung, dass Zusatz von concentrirter Kochsalzlösung die Gerinnung verzögerte, während Zusatz von Milchzuckerlösung ohne Wirkung blieb, ist leider auch kein bindender Beweis, da jede Angabe über die Menge der zugesetzten Kochsalzlösung fehlt und es also nicht möglich ist zu sagen, ob das Salz oder die Verdünnung die hemmende Wirkung hervorgebracht habe. Uebrigens ist nicht zu übersehen, dass der Versuch mit concentrirter Kochsalzlösung am wenigsten geeignet ist, einen wesentlichen Unterschied zwischen der Caseïn- und der Fibrinogengerinnung zu

beweisen; denn wenn es auch möglich ist, durch Zusatz von concentrirter Kochsalzlösung die Caseïngerinnung zu verzögern oder zu verhindern, darf man doch nicht vergessen, dass auch die Fibrinogengerinnung mit der grössten Leichtigkeit durch concentrirte Kochsalzlösung aufgehoben werden kann.

Wenn man sich nun weiter erinnert, dass es leicht gelingt mittelst der Kochsalzmethode Caseïnlösungen darzustellen, welche trotz der Verunreinigung mit Na Cl sogar noch rascher als die Milch mit Lab gerinnen, so muss es etwas schwierig werden, an eine stark gerinnungshemmende Wirkung dieses Salzes zu glauben. Ich habe es desshalb auch für wichtig gehalten, die Wirkung der neutralen Alkalisalze auf die Caseïngerinnung zum Gegenstande einer besonderen Untersuchung zu machen, und obwohl ich mit mehreren Salzen Versuche angestellt habe, bin ich doch nur mit dem Na Cl und dem Ka Cl einigermaassen fertig, wesshalb ich auch nur über die Wirkung dieser Salze hier berichten kann.

Meine mit diesen Salzen ausgeführten Versuche sprechen nun in der That nicht für einen grossen Unterschied zwischen der Caseïn- und der Fibrinogengerinnung, sondern sie zeigen im Gegentheil, dass auch in Bezug auf die Wirkung der Neutralsalze eine gewisse Übereinstimmung zwischen den beiden Processen obwaltet. So wie das Kochsalz je nach der Versuchsanordnung befördernd oder hemmend auf die Fibrinogengerinnung virken kann, ebenso wirkt es nämlich auch auf die Caseïngerinnung nach Umständen entweder befördernd oder hemmend ein, und es ist sogar möglich eine solche Versuchsanordnung zu treffen, dass die Caseïngerinnung erst nach Zusatz von Na Cl oder Ka Cl von Statten geht. Da die Chloralkalien also, wie bei der Fibrinogengerinnung so auch bei der Gerinnung des Caseïns, je nach der Versuchsanordnung einen wechselnden, sogar entgegengesetzten Einfluss ausüben können, ist es mir auch nöthig gewesen, eine nicht unbedeutende Menge von Versuchen anzustellen. Leider ist es mir nun, wegen des schon ziemlich grossen Umfanges dieser Abhandlung, nicht möglich, hier eine grössere Zahl von Versuchen anzuführen, und ich muss mich also darauf beschränken, die obigen Behauptungen nur durch ein paar Versuche zu erhärten.

Zu denjenigen Versuchen, in welchen eine Verdünnung mit Wasser nicht vermieden werden musste, wurden die Salze in wässriger Lösung verwendet, wobei selbstverständlich Sorge dafür getragen wurde, dass sämmtliche Proben nur in Bezug auf den Salzgehalt von einander abwichen und sonst ganz gleich waren. Wenn dagegen die Verdünnung mit Wasser vermieden werden musste löste ich das getrocknete und gewogene Salz in die Milch auf und verdünnte mit mehr Milch bis eine.

Lösung von 20 Gm Salz in 100 Cc. Milch erhalten wurde. Diese Milch wurde darauf mit frischer Milch in den erwünschten Verhältnissen vermischt. Da die Kalksalze, wie ich oben gezeigt habe, einen ausserordentlich grossen Einfluss auf die Caseïngerinnung ausüben, habe ich nur mit ganz reinen Salzen gearbeitet. Da die Neutralsalze, wenn sie in grösserer Menge vorhanden sind, das Caseïn bei Körperwärme auch ohne Labzusatz ausfällen können, was besonders leicht mit den reinen Lösungen von Caseïncalciumphosphat gelingt, habe ich es nie unterlassen auch Controleversuche ohne Lab anzustellen. Die Angaben über den Gehalt an Neutralsalzen wie auch über die durch Zusatz von Salzlösung allein oder von Salzlösung und Wasser stattgefundene Verdünnung mit Wasser beziehen sich auf die Versuchsflüsssigkeit vor dem Fermentzusatze. Im Übrigen dürfte die Versuchsanordnung ohne Weiteres leicht verständlich sein. Ich führe zuerst ein paar Versuche mit Milch an.

Die Milch enthielt 2,96 % Caseïn und 0,360 % unlösliche Salze. Das Kochsalz wurde in diesem Versuche direct in der Milch gelöst und es fand also keine Verdünnung mit Wasser statt. Von der Fermentlösung, $F = \frac{1}{100}$, kam 1 Cc. auf je 10 Cc. Versuchsflüssigkeit. Die Temperatur var 38—38,5° C.

	Gehalt der Versuchsflüssigkeit an Na Cl	Gerinnungszeit
N:o 1)	0,000 % Na Cl	Gerinnung nach 3 Min. 30 Sec.
» 2)	0,010 % Na Cl	D:o d:o 3 Min.
» 3)	0,025 % Na Cl	D:o d:o 3 Min.
» 4)	0,050 % Na Cl	D:o d:o 3 Min.
» 5)	0,100 % Na Cl	D:o d:o 3 Min.
» 6)	0,250 % Na Cl	D:o d:o 3 Min.
» 7)	0,500 % Na Cl	D:o d:o 3 Min. 30 Sec.
» 8)	1,000 % Na Cl	D:o d:o 4 Min.
» 9)	2,500 % Na Cl	D:o d:o 7 Min.
» 10)	5,000 % Na Cl	D:o d:o 11 Min.
» 11)	10,000 % Na Cl	D:o d:o 21 Min.

Da es nicht immer leicht ist die Gerinnungszeit genau auf Bruchtheile einer Minute auzugeben, kann ich kein Gewicht darauf legen, dass für die Na Cl-freie Probe 1 die Gerinnungszeit eine halbe Minute länger als für die 5 nachfolgenden, chlornatriumfreien Proben war. In diesem Versuche, in welchem keine Verdünnung mit Wasser stattgefunden hatte, war also keine beschleunigende sondern im Gegentheil eine hemmende Wirkung des Salzes zu sehen. Diese hemmende Wirkung trat indessen erst bei einem Zusatze von 1 % Na Cl sicher auf, und selbst die Wirkung von der grössten Kochsalzmenge, 10 %, war eine schwächere als die hemmende Wirkung, welche oft von derselben Salzmenge auf die Fibrinogengerinnung ausgeübt wird.

Anders gestaltet sich die Wirkung des Kochsalzes bei Verdünnung der Milch mit Wasser. In diesem Falle kann nämlich — wie der folgende Versuch zeigen wird — das Kochsalz eine die Gerinnung befördernde Wirkung ausüben.

Dieselbe Milch wie zu dem vorigen Versuche. Das Na Cl wurde in wässriger Lösung zugesetzt so dass die Verdünnung in allen Proben $W = \frac{1}{5}$ war. Von der Fermentlösung, $F = \frac{1}{200}$ kam auf 10 Cc. Versuchsflüssigkeit 1 Cc. Die Temperatur war 38,5—39° C.

Gehalt der Versuchsflüssigkeit an Na Cl	*Gerinnungszeit*
N:o 1) 0,000 % Na Cl	Gerinnung nach 9 Min.
» 2) 0,025 % Na Cl	D:o d:o 7 Min.
» 3) 0,050 % Na Cl	D:o d:o 6 Min. 30 Sec.
» 4) 0,100 % Na Cl	D:o d.o 6 Min.
» 5) 0,250 % Na Cl	D:o d:o 3 Min. 30 Sec.
» 6) 0,500 % Na Cl	D:o d:o 4 Min.
» 7) 1,000 % Na Cl	D:o d:o 6 Min.
» 8) 2,500 % Na Cl	D:o d:o 9 Min.
» 9) 5,000 % Na Cl	D:o d:o 16 Min.

In diesem Versuche trat also eine unzweifelhaft gerinnungsbeschleunigende Wirkung des Kochsalzes hervor, eine Wirkung, welche mit derjenigen des Chlorcalciums darin übereinstimmt, dass die Gerinnungsgeschwindigkeit mit steigenden Salzzusätzen bis zu einen gewissen Grade zunimmt, um von da ab mit weiter gesteigerten Salzzusätzen wieder abzunehmen.

In derselben Weise wie das Na Cl wirkt — wie die folgenden Versuche zeigen werden — auch das Ka Cl.

Die Milch enthielt 2,53 % Caseïn und 0,345 % unlösliche Salze. In dem Versuche *a* fand keine Verdünnung mit Wasser statt; in *b* dagegen war überall die Verdünnung mit Wasser, $W = \frac{1}{3}$. Von der Fermentlösung, $F = \frac{1}{100}$, kam in beiden Versuchen 1 Cc. auf je 10 Cc. Versuchsflüssigkeit. Die Temperatur in beiden Versuchen 39—39,5° C.

a. Keine Verdünnung mit Wasser.

Gehalt der Versuchsflüssigkeit an Ka Cl	*Gerinnungszeit*
N:o 1) 0,000 % Ka Cl	Gerinnung nach 2 Min.
» 2) 0,100 % Ka Cl	D:o d:o 2 Min.
» 3) 0,250 % Ka Cl	D:o d:o 2 Min.
» 4) 0,500 % Ka Cl	D:o d:o 2 Min. 30 Sec.
» 5) 1,000 % Ka Cl	D:o d:o 2 Min. 30 Sec.
» 6) 2,500 % Ka Cl	D:o d:o 3 Min.
» 7) 5,000 % Ka Cl	D:o d:o 6 Min.
» 8) 10,000 % Ka Cl	D:o d:o 10 Min.

b. Verdünnung mit Wasser, $W = \frac{1}{3}$.

	Gehalt der Versuchsflüssigkeit an Ka Cl	Gerinnungszeit
N:o	1) 0,000 % Ka Cl	Gerinnung nach 27 Min.
»	2) 0,025 % Ka Cl	D:o d:o 16 Min.
»	3) 0,050 % Ka Cl	D:o d:o 11 Min.
»	4) 0,100 % Ka Cl	D:o d:o 6 Min. 30 Sec.
»	5) 0,250 % Ka Cl	D:o d:o 4 Min.
»	6) 0,500 % Ka Cl	D:o d:o 3 Min.
»	7) 1,000 % Ka Cl	D:o d:o 4 Min.
»	8) 2,500 % Ka Cl	D:o d:o 7 Min. 30 Sec.
»	9) 5,000 % Ka Cl	D:o d:o 14 Min.
»	10) 10,000 % Ka Cl	D:o d:o 22 Min.

Der Versuch *a* zeigt wiederum, dass die gerinnungshemmende Wirkung der Chloralkalien nur eine schwache, erst bei grösserem Salzzusatze sich kundgebende ist, und der Versuch *b* zeigt, dass die Chloralkalien ebenso wohl auf die Caseïn- wie auf die Fibrinogengerinnung einen günstigen Einfluss ausüben können. Besonders deutlich tritt die beschleunigende Wirkung des Salzes in diesem Versuche hervor, und man sieht übrigens sogleich wie die Gerinnungsgeschwindigkeit mit steigenden Salzzusätzen erst zu und dann wieder abnimmt. Ein anderer Umstand, von einem besonderen Interesse ist die Beschaffenheit der Gerinnsel. Die Festigkeit der Gerinnsel ist nämlich am grössten in denjenigen Proben, welche die grösste Gerinnungsgeschwindigkeit zeigten, und in dem zuletzt angeführten Versuche *b* waren die Gerinnsel in der Ka Cl-freien Probe 1 locker und flockig, in den Proben mit grösserer Gerinnungsgeschwindigkeit waren sie fester, in den Proben 5, 6 und 7 bildeten sie eine feste, zusammenhängende Masse und in den Proben 8, 9 und 10 waren sie wiederum weniger fest.

In derselben Weise wie auf die Milch wirken die Chloralkalien auch auf die Lösungen von reinem Caseincalciumphosphat, doch kann man in den Versuchen mit solchen Lösungen die gerinnungshemmende Wirkung leichter als die gerinnungsbefördernde constatiren. Wenn man gerinnungsfähige Lösungen von Caseincalciumphosphat von etwa demselben Caseingehalte wie die Milch bereitet, so kann man leicht, wenn die Verdünnung mit Wasser vermieden wird, die gerinnungshemmende Wirkung der Chloralkalien beobachten, während man umgekehrt nach Verdünnung mit Wasser die gerinnungsbefördernde Wirkung constatiren kann. Da es indessen weniger leicht gelingt die gerinnungsbeschleunigende Wirkung zu zeigen, will ich mich damit begnügen nur diese durch einen Versuch zu zeigen.

Die Caseïnlösung enthielt 3,011 % Caseïn, 0,203 % $Ca_3P_2O_8$ und 0,043 % CaO. 10 Cc. dieser Lösung mit 1 Cc. einer Fermentlösung, $F = \frac{1}{100}$, versetzt, geronnen bei 37° C. fast angen-

blicklich. Mit so viel Wasser verdünnt, dass $W = \frac{6}{10}$ war, gerann sie bei derselben Temperatur gar nicht mit Lab innerhalb 24 Stunden. In dem nun anzuführenden Versuche war $W = \frac{6}{10}$. Von der Fermentlösung, $F = \frac{1}{100}$, kam 1 Cc. auf je 10 Cc. Versuchsflüssigkeit. Die Temperatur = 39° C.

Gehalt der Versuchsflüssigkeit an Na Cl	*Gerinnungszeit*
N:o 1) 0,000 % Na Cl	Keine Gerinnung innerhalb 24 St.
» 2) 0,500 % Na Cl	Gerinnung nach 1 St.
» 3) 1,000 % Na Cl	D:o d:o 0 St. 26 Min.
» 4) 5,000 % Na Cl	D:o d:o 1 St. 13 Min.

In diesem Versuche gerann also die verdünnte Na Cl-freie Caseinlösung gar nicht mit Lab, während die 3 Na Cl-haltigen Proben mehr weniger rasch gerannen, und dieser Versuch lehrt also, dass die Chloralkalien auch unter Umständen nothwendige Bedingungen für die Caseingerinnung werden können. Wie durch Zusatz von $Ca\,Cl_2$ kann also die schädliche Wirkung von Verdünnung mit Wasser auch durch Zusatz von Chloralkalien aufgehoben werden.

Fassen wir das Bisherige zusammen, so wird man es wohl nicht befremdend finden, wenn ich der Ansicht Schmidts nicht ganz beitreten kann. Wenn nämlich Schmidt von einer hemmenden Wirkung der neutralen Alkalisalze auf die Caseingerinnung spricht, will ich zwar gern die Berechtigung einer solchen Behauptung zugeben; wenn er aber daraus weiter folgert, dass die beiden Processe, die Casein- und die Fibrinogengerinnung ihrem Wesen nach sehr verschiedener Art sein müssen, kann ich nicht mehr mit ihm einverstanden sein.

Es ist nämlich wahr, dass die neutralen Alkalisalze hemmend auf die Caseingerinnung wirken können, aber dieselbe Wirkung üben sie auch auf die Fibrinogengerinnung aus, und in dieser Beziehung herrscht also kein Gegensatz zwischen den beiden Processen. Die hemmende Wirkung der neutralen Alkalisalze auf die Caseingerinnung ist übrigens nur eine schwache und vor Allem scheinen grössere Kochsalzmengen weit weniger hemmend auf die Casein- als auf die Fibrinogengerinnung einzuwirken. Ich habe sogar wiederholt gesehen, dass nicht einmal ein Zusatz von 20 % Na Cl die Caseingerinnung verhindern oder bedeutend verzögern kann, und es scheint sogar, als wirkten sehr grosse Kochsalzmengen wiederum günstig auf die Gerinnung. Da indessen sehr grosse Kochsalzmengen auch ohne Lab das Caseïn ausfällen können und da die nöthigen Controleversuche mit nicht kleinen Schwierigkeiten verbunden sind, will ich mich über die Wirkung von sehr grossen Kochsalzmengen nicht weiter hier aussprechen.

Es ist weiter unzweifelhaft wahr, dass die Chloralkalien einen günstigen Einfluss auf die Fibrinogengerinnung ausüben können, aber dasselbe gilt, wie ich gezeigt habe, auch für die Caseingerinnung. Die günstige Wirkung der Chloralkalien auf die Fibrinogengerinnung ist eine doppelte, in so fern als dadurch einerseits die Gerinnung beschleunigt und andererseits die Menge und Festigkeit des Gerinnungsproduktes vermehrt wird. In ganz derselben Weise giebt sich auch die günstige Wirkung der Chloralkalien auf die Caseingerinnung kund. Einerseits wird nämlich dadurch die Gerinnung beschleunigt und andererseits die Menge und Festigkeit des Gerinnsels vermehrt. Die Wirkung der Chloralkalien auf die Menge des Gerinnungsproduktes kann bei der Fibrinogengerinnung so weit gehen, dass eine Gerinnung überhaupt erst nach Zusatz von einer genügenden Salzmenge stattfindet, und ganz dasselbe haben wir eben in einem Gerinnungsversuche mit Caseïn beobachtet.

In Bezug auf die Wirkung der neutralen Alkalisalze besteht also zwischen den beiden Processen nicht, wie Schmidt angiebt, ein wesentlicher Gegensatz sondern vielmehr eine grosse Übereinstimmung. Dass auch in Bezug auf die Wirkung des Chlorcalciums eine solche Übereinstimmung vorhanden ist, habe ich schon oben gezeigt. Es ist nun offenbar, dass bei der Casein- wie der Fibrinogengerinnung die wechselnde, oft sogar entgegengesetzte Wirkung eines Salzes von der Relation zwischen dem Salze, dem Wasser und dem gerinnungsfähigen Eiweisse abhängig sein muss, und es ist desshalb nicht leicht zu sagen, bis zu welchem Grade eine Übereinstimmung oder ein Unterschied in Bezug auf die Wirkung der Salze zwischen den beiden Processen obwaltet. Die Wirkung der Salze auf die Fibrinogengerinnung ist nämlich nur für Lösungen von unbekannter Zusammensetzung festgestellt worden, aber allem Anscheine nach sind bisher nur relativ fibrinogenarme Flüssigkeiten mit relativ caseinreichen Lösungen verglichen worden, und es ist also sehr wohl möglich, dass Casein- und Fibrinogenlösungen von demselben procentischen Gehalte an Eiweiss gegenüber derselben Salzmenge ganz anders sich verhalten. Es können also in Bezug auf eine Übereinstimmung oder einen Unterschied in der Wirkung der neutralen Alkalisalze auf die Casein- und Fibrinogengerinnung nur mit der grössten Vorsicht bestimmte Schlüsse gezogen werden; aber nach den bisher gewonnenen Erfahrungen ist die Übereinstimmung grösser als der Unterschied.

Selbst wenn übrigens in Bezug auf die Wirkung der Neutralsalze nur ein bestimmter Unterschied zwischen den beiden Processen bestände,

würde dies nach meiner Ansicht gar nicht beweisen, dass die beiden Processe ihrem Wesen nach verschiedener Art sein müssen. Das Labferment ist nämlich allem Anscheine nach ebenso wenig mit dem Fibrinfermente identisch wie das Casein mit dem Fibrinogen identisch ist, und nun hat Nasse [1]) bekanntlich eine bestimmte Abhängigkeit der Fermente in ihrer Wirkung von der gleichzeitigen Anwesenheit von Salzmolekülen gefunden, eine abhängigkeit, welche specifisch für jedes Ferment ist. Ebenso wenig wie man die Zuckerbildung aus Stärke mittelst Diastase als einen von der Zuckerbildung mit Speichel ihrem Wesen nach sehr verschiedenen Process auffassen kann, weil ein Kochsalzgehalt von 4 % auf jene eine hemmende und auf diese eine günstige Wirkung ausübt, ebenso wenig würde man, nach meiner Ansicht, berechtigt sein, wegen einer ungleichen Wirkung der Neutralsalze auf die beiden Processe, die Casein- und die Fibrinogengerinnung als zwei ihrem Wesen nach grundverschiedene Processe aufzufassen.

Da ich nun zudem gefunden habe, dass bezüglich der Wirkung von Chlorcalcium und Chloralkalien kein scharfer Gegensatz sondern vielmehr eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden Processen obwaltet, finde ich es, in Anbetracht der grossen Übereinstimmung, welche auch in anderen Hinsichten zwischen der Casein- und der Fibrinogengerinnung besteht, nicht mehr möglich anzunehmen, dass — wie Alexander Schmidt glaubt — die beiden Processe ihrem Wesen nach sehr verschiedener Art sein müssen.

---

[1]) Otto Nasse: Untersuchungen über die ungeformten Fermente. Pflügers Archiv Bd 11

Berichtigungen.

Seite	4,	Zeile	9	von	oben	statt	Ausfüllung	lies:	Ausfällung
»	4.	»	17	von	unten	»	ein bisher bekannter	»	einen bisher bekannten
»	10,	»	1	von	oben	»	der rückständige	»	den rückständigen
»	13,	»	2	»	»	»	un	»	und
»	35,	»	13	»	»	»	forlgetetzt	»	fortgesetzt

Köhler L.